



# **Universidad Austral de Chile**

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dra. Susan Hess F.  
**INSTITUTO:** Química.  
**FACULTAD:** Ciencias.

**PROFESOR CO-PATROCINANTE:** Prof. Magdalena  
Romero A.

**INSTITUTO:** Botánica.  
**FACULTAD:** Ciencias.

**“EFECTO DE LA RADIACIÓN UV-B EN LA SÍNTESIS DE PIGMENTOS  
PROTECTORES Y FOTOSINTÉTICOS EN PLÁNTULAS DE *Aextoxicon punctatum*”.**

Tesis de Grado presentada como  
parte de los requisitos para optar  
al Título de Químico Farmacéutico.

**XIMENA DEL CARMEN AICHELE ALVARADO**

VALDIVIA-CHILE

2006

*A mi Abuelita, mamá y a mi  
recordada Profesora Carin Akesson...*

*"Dios es nuestro amparo y fortaleza,  
nuestro pronto auxilio en las  
tribulaciones.*

*Por tanto, no temeremos, aunque la  
tierra sea removida, y se traspasen los  
montes al corazón del mar, aunque  
bramen y se turben sus aguas, y tiemblen  
los montes a causa de su braveza".*

*Salmos 46:1-3.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a la Universidad Austral de Chile y a la Escuela de Química y Farmacia por darme la oportunidad de ser una profesional, agradecer al Dr. Humberto Dölz y a las circunstancias de la vida por haberme dado la posibilidad de conocerlo.

Al Instituto de Química especialmente a la Dra. Susan Hess por su disposición, tiempo y por la fuerza con que me empujó en momentos dificultosos a terminar este trabajo de Tesis. Al Prof. Juan Carlos Paredes quien me apoyó en todo momento alentándome a continuar y conseguir finalmente los mejores resultados, agradezco su disponibilidad de espacio y de tiempo y el haberme facilitado todo lo necesario para cumplir con mis objetivos. Agradezco además a Joel Pardo del Instituto de Farmacia, quién me ayudo a superar algunas “faltas”. A la Prof. Magdalena Romero del Instituto de Botánica por su dedicación y paciencia. Le doy gracias por haberme ayudado tanto.

En forma muy especial y con todo mi cariño agradezco a mi Prof. Carin Akesson quien me acompañó en los comienzos de la Tesis dándome todas las facilidades y disposición dentro del Instituto de Farmacia. Para mí, fue y sigue siendo aunque no esté con nosotros un ejemplo de dedicación y amor por su trabajo, un modelo a seguir como persona y como profesional Químico Farmacéutico.

Por último, y lo más importante debo dar gracias al Señor por haberme ayudado a concluir mi proceso formativo y culminar con este trabajo de Tesis. Agradecer a mi abuelita Lila, mamá Angélica, hermana Andrea y tía Inés por darme su apoyo en todo momento y tener tanta paciencia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Dedicatoria	
Agradecimientos.....	I
Índice de contenidos.....	II
Índice de figuras.....	V
Índice de tablas.....	VII
1. RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. Energía solar.....	3
2.2. Flavonoides.....	8
2.3. Pigmentos fotosintetizadores.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Material vegetal y características generales.....	21
3.1.1. Lugar de trabajo.....	22
3.2. Tratamiento ultravioleta tipo B.....	22
3.3. Metodología.....	24
3.3.1. Determinación de parámetros fisiológicos.....	24
3.3.2. Determinación de contenido hídrico total.....	24

3.3.3. Determinación de la estructura histológica de las hojas.....	25
3.3.4. Determinación del contenido de cenizas.....	25
3.3.5 Determinación de pH y conductividad en suelo.....	26
3.4. Reactivos empleados en análisis de pigmentos foliares.....	28
3.5. Determinación de pigmentos foliares.....	29
3.5.1. Extracción de pigmentos foliares.....	29
3.5.2. Separación de pigmentos foliares.....	31
3.5.3. Hidrólisis de flavonoides.....	35
3.5.4. Determinación de pigmentos fotosintéticos.....	38
3.5.5. Utilización cromatografía de capa fina en la identificación de flavonoides y sus azúcares sustituyentes.....	39
3.5.6. Identificación de flavonoides.....	41
3.5.7. Identificación de azúcares.....	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Determinación de parámetros morfológicos en <i>Aextoxicon punctatum</i> .....	43
4.1.1. Número de hojas.....	43
4.1.2. Altura de tallo.....	43
4.1.3. Crecimiento de raíz.....	43
4.1.4. Histología de la hoja.....	46

4.2. Contenido hídrico y biomasa.....	49
4.2.1. Redistribución de biomasa.....	50
4.3. Contenido de cenizas.....	51
4.4. pH y Conductividad del suelo.....	53
4.5. Análisis de pigmentos foliares en <i>Aextoxicon punctatum</i> .....	55
4.5.1. Determinación de pigmentos foliares totales.....	55
4.5.2. Determinación de clorofila y carotenos.....	57
4.5.3. Hidrólisis.....	59
4.5.4. Identificación de flavonoides.....	61
4.5.5. Identificación de azúcares.....	64
5. DISCUSIÓN.....	67
6. CONCLUSIÓN.....	74
7. GLOSARIO.....	75
8. BIBLIOGRAFÍA.....	76
ANEXO 1 Preparación Oxalato de anilina.....	82
ANEXO 2 Tabla pH en suelo .....	83
ANEXO 3 Tabla absorbancia máxima flavonoides, Clorofila y caroteno.....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Espectro electromagnético y región de UV visible.....	7
Figura 2	Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.....	9
Figura 3	Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.....	10
Figura 4	Estructuras de algunos carotenoides.....	14
Figura 5	Estructura de clorofila <i>a</i> y <i>b</i> .....	19
Figura 6	Cámara de tratamiento de radiación UV-B.....	23
Figura 7	Espectrofotómetro UNICAM (serie UV 500).....	30
Figura 8	Embudos de decantación cubiertos con papel aluminio.....	32
Figura 9	Espectros de absorción de carotenos y clorofilas.....	33
Figura 10	Espectro de absorción de flavonoides.....	34
Figura 11	Organigrama de hidrólisis.....	37
Figura 12	Efecto del exceso de radiación UV-B en el número de hojas en plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	44
Figura 13	Efecto del exceso de radiación UV-B en la tasa de crecimiento de tallo y raíz en plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	45
Figura 14	Corte transversal de lámina foliar.....	48
Figura 15	Efecto de la radiación UV-B en el Peso Seco y contenido hídrico.....	49
Figura 16	Redistribución de biomasa.....	50
Figura 17	Efecto de la radiación UV-B en el contenido de cenizas.....	52

Figura 18	pH y Conductividad en suelos de cultivo de plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	54
Figura 19	Contenido de flavonoides totales en extracto foliar de plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	56
Figura 20	Concentración de clorofilas y carotenos en $\mu\text{g/ml}$ de extracto foliar.....	58
Figura 21	Espectro de absorción de flavonoides hidrolizados.....	60
Figura 22	Cromatoplaaca de poliamida bajo lámpara UV para identificación de flavonoides.....	63
Figura 23	Cromatoplaaca de celulosa usada para identificar Azúcares.....	66

**ÍNDICE DE TABLAS**

TABLA 1	Parámetros morfométricos de lámina foliar de plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	47
TABLA 2	Distancias de migración (Rf) de estándares puros de flavonoides.....	61
TABLA 3	Distancias de migración (Rf) de muestras de extractos foliares de plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	62
TABLA 4	Distancias de migración (Rf) de estándares puros de glúcidos y de muestras de extractos foliares de plántulas de <i>A. punctatum</i> .....	65

## 1.- RESUMEN

Para determinar el efecto sobre el contenido de pigmentos foliares y, sobre la síntesis de azúcares que ejerce la radiación UV-B en las plantas, se estudiaron plántulas de *A. punctatum* bajo condiciones de laboratorio y mantenidas bajo exposición a una dosis diaria de radiación ultravioleta de  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 6 horas diarias, durante un período de 6 semanas, la que fue aportada por 4 lámparas Q panel, UV 313 (Hanna Instruments Neurtek).

Las plántulas mantenidas bajo radiación UV-B disminuyeron la tasa de crecimiento de tallo y raíz respecto de su control, observándose una tendencia a la recuperación de estos parámetros al término del tratamiento, mientras que el número de las hojas aumentó en igual período. Así también, se observaron cambios en la biomasa a nivel radicular y caulinar.

Al finalizar la 6ª semana se evidenció que la radiación UV-B indujo aumento en la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila +53,90% y carotenos +184,77%) y del flavonoide Quercetina en +162,60%. Además, en extractos de estas plántulas tratadas, se logró identificar el glúcido sustituyente de Quercetina, encontrándose que este correspondía a Galactosa.

Por lo cual en *A. punctatum* se estaría reportando por primera vez la identificación de compuestos antioxidantes y de azúcares sustituyentes en moléculas de flavonoides, como producto de un incremento en exposición a radiación UV-B.

## SUMMARY

In order to determine the effect of UV-B radiation on foliar pigment contents and on sugar synthesis, *A. punctatum* plantlets were studied under laboratory conditions and maintained under daily ultraviolet radiation exposition, with a dose of  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , from 4 Q panel lamps, UV 313 (Hanna Instruments Neurtek), during 6 hours during under 6 weeks.

The growth rate of stems and roots decreased in plantlets maintained under UV-B radiation, compared to the controlling group. A tendency towards recovery of this rate was observed by the end of the treatment, while the number of leaves increased in the same period. Also, changes in biomass at rooted and cauline levels were observed.

At the end of the treatment, UV-B radiation induced an increment on photosynthetic pigments (chlorophyll +53.90% and carotenes +184.77%) and flavonoids (Quercetine in +162.60%) concentration. Besides, the substituting glucid of Quercetine was identified in extracts of the treated plants, finding that it corresponds to Galactose.

Therefore, the identification of antioxidant compounds and substituting sugar in flavonoid molecules is reported for the first time in *A punctatum*, as a result of an increase in the exposure to UV-B radiation.

## 2.- INTRODUCCIÓN

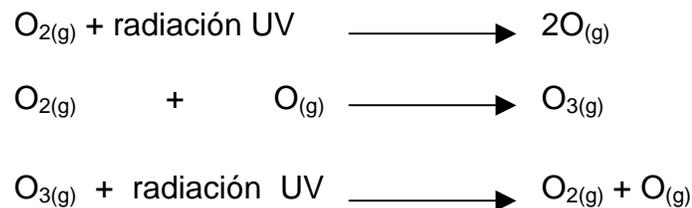
### 2.1.- Energía solar

La energía solar se traslada a través de ondas electromagnéticas denominadas radiación. El contenido energético de radiación solar que alcanza la superficie terrestre, depende de su longitud de onda, y comprende: radiaciones de onda corta (280 – 400 nm) denominadas radiación ultravioleta (UV), radiación fotosintéticamente activa (PAR) que es sensible al ojo humano (400 – 780 nm) y, la radiación infrarroja (750 a 4000 nm), la cual afecta el balance térmico y los procesos morfogénicos de las plantas (Fig. 1) (Steubing *et al.* 2002).

La radiación ultravioleta se divide en tres tipos: radiaciones UV-A (380-320 nm) la cual es débilmente absorbida por el ozono estratosférico, llegando a la superficie de la tierra, y produce en las plantas diferentes reacciones fotoquímicas. El nivel de radiación de ésta se mantiene relativamente constante (Björn, 1999); radiaciones UV-B (320-280 nm) la cual es filtrada por el ozono estratosférico también llamada UV biológicamente activa, representa el 5% del espectro de radiación UV y el 0.25% de toda la radiación solar que llega a la Tierra (Dirección meteorológica de Chile); y radiaciones UV-C con longitudes de onda menores que 280 nm y que son absorbidas por la atmósfera no llegando a alcanzar la superficie terrestre (Steubing *et al.* 2002). Debido a que la energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, la radiación UV-C, es la radiación mayormente energética la cual es incompatible con todas las formas de vida (Björn, 1999).

La penetración en la atmósfera terrestre de las radiaciones de onda corta depende en gran medida del grosor de la capa de ozono, quien es la encargada de filtrar la radiación mediante reflejo, desvío o absorción, por lo cual sólo ingresa hacia la superficie de la tierra aproximadamente un 26% de esta radiación (Steubing *et al.* 2002).

El ozono es un gas producido naturalmente, a través de una serie de reacciones fotoquímicas, en donde la radiación actúa disociando oxígeno molecular ( $O_2$ ) en oxígeno atómico (O). Este oxígeno se combina rápidamente con oxígeno molecular formando el Ozono ( $O_3$ ) (Spiro *et al.* 2004):



La capa de ozono, que tiene dos funciones esenciales: proteger a los organismos vivos de los efectos nocivos de la radiación UV y ser la fuente de calor que origina la estratificación de la atmósfera en una zona tranquila como estratósfera y una zona turbulenta como la tropósfera, ha sido alterada por la actividad humana (Spiro *et al.* 2004). Durante las últimas décadas la capa de ozono se ha deteriorado por efecto de sustancias químicas llamadas ODSs (del inglés, Ozone Depleting Substances) tales como clorofluorocarbonos (CFCs), hidroclorofluorocarbonos (HCFCs), metil bromuro

(MeBr) y otros compuestos industriales que contienen halógenos. Se estima, que de no haber realizado un control de los niveles de CFCs y halógenos, la exposición a esta radiación en altitudes medias del hemisferio norte, se habría duplicado hacia el año 2050 (Sharma, 2001). En Valdivia, los promedios mensuales de ozono obtenidos con el TOMS (Total Ozone Mapping Spectrometer), muestran una tendencia decreciente de 5,6 % por década desde 1978 (Lovengreen *et al.* 2002). Los cambios producidos en el ozono estratosférico son medidos en unidades Dobson (DU) en donde 1 DU corresponde a 0,01 mm del espesor de la capa de ozono, a temperatura y presión normales (0°C y 1 atm) (Kohen *et al.* 1995).

La radiación solar tiene efectos fisiológicos y térmicos sobre los organismos vivientes. En seres humanos, evidencia fehaciente indica que la exposición prolongada a la radiación UV, y debido a su efecto acumulativo, provoca quemaduras en la piel y daño en los ojos, lo que en un largo plazo, provocaría cataratas, daño al sistema inmune y cáncer de piel, sobre todo en individuos de piel clara. Sin embargo, la radiación también ejerce efectos beneficiosos para la vida humana, un ejemplo de ello es la activación de la síntesis de vitamina D a nivel de piel, realizada por la radiación UV-B, mientras que la radiación UV-A es la responsable del bronceado inmediato pero también del fotoenvejecimiento. Este último tipo de radiación es usada en clínica en tratamientos dermatológicos, como fototerapia en el tratamiento de la psoriasis (Spiro *et al.* 2004).

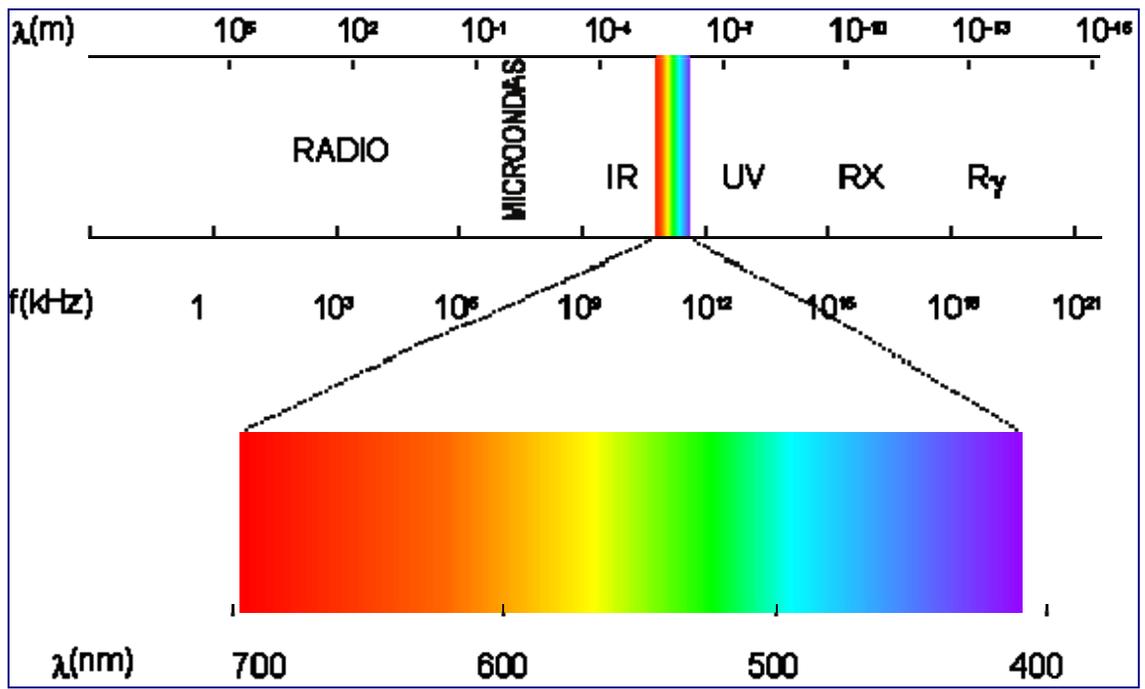
En las plantas, la energía solar (que incluye PAR: UVA: UVB = 100:10:1) constituye la principal fuente de energía para la mantención de la fotosíntesis aunque del total de energía solar incidente sobre nuestro planeta, sólo el 0,3% de ella es

utilizada en este proceso (Spiro *et al.* 2004). Sin embargo, cuando los niveles de radiación ultravioleta sobrepasan los niveles críticos para cada especie, el efecto puede ser negativo o dañarlos en forma irreversible puesto que el sistema fotosintético está ajustado a determinados rangos de radiación. Particularmente sensible es el fitoplancton, considerado como el primer eslabón de la cadena alimenticia marina y que se distribuye principalmente sobre los estratos más superficiales del océano. Se ha establecido una correlación entre la disminución de la población de fitoplancton y el decrecimiento de la capa de ozono (Spiro *et al.* 2004).

Los efectos observados en las plantas en respuesta a disminución de la capa de ozono y aumento de radiación UV, tiene como blancos los ácidos nucleicos, causando un daño potencial en los aparatos fotosintéticos, para lo cual algunas desarrollan mecanismos de defensa contra esta radiación tales como: acumulación de compuestos absorbedores de radiación UV en las hojas, reducción del área foliar y disminución del crecimiento (Zavala *et al.* 2002). Con estos datos se podría asumir que la “señal” UV-B es también un importante regulador de la morfología y del desarrollo de la planta (Sullivan *et al.* 1999).

En forma más específica, por efecto de un exceso de radiación UV-B se han observado variaciones en la histología foliar, cambios cuantitativos o cualitativos en ceras epicuticulares, así como incremento en el grosor y en el peso de la hoja. La acumulación de pigmentos absorbedores, reducen la transmitancia epidermal de la radiación UV-B y otorgan protección a las estructuras fotosintetizadoras más sensibles (Rozema *et al.* 1999). Entre estos pigmentos están los flavonoides los cuales son una

clase de compuestos que se acumulan en la epidermis de la hoja en respuesta a la radiación UV-B (Hess *et al.* 2002).



**Figura 1.-** Espectro electromagnético y región de UV visible (400- 700 nm).

## 2.2.- Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, hojas, flores, frutas y semillas y son los responsables del color de muchas frutas y verduras, son considerados los más comunes constituyentes biológicos de las plantas (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

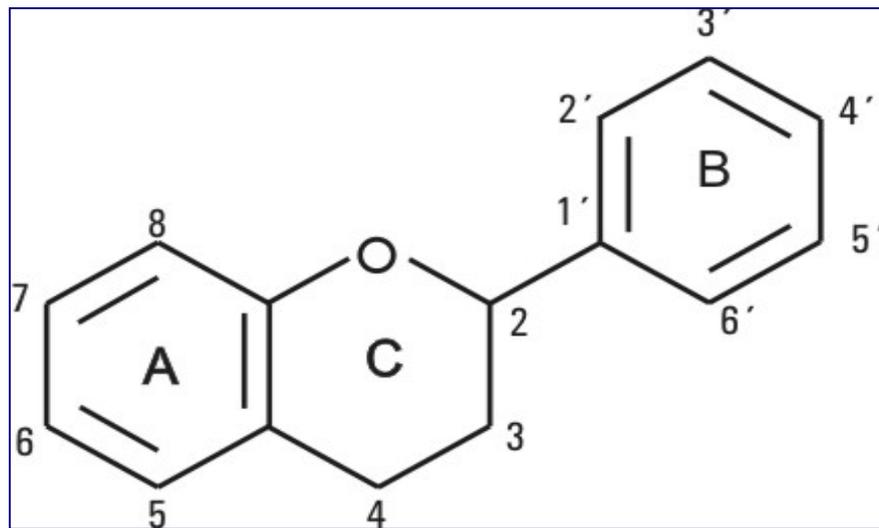
Fueron descubiertos por Szent- György en 1930 cuando aisló de la cáscara del limón, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C<sub>2</sub> (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

Desde el punto de vista químico, los flavonoides son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, con un esqueleto básico de 15 carbonos, difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Fig.2). En las plantas se encuentran tanto en estado libre como glicósidos. (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

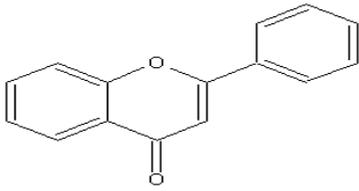
De acuerdo al grado de oxidación del puente de tres carbonos han sido clasificados en diferentes grupos tales como: antocianinas, flavonas, flavonoles e isoflavonas (Fig.3) (Taiz *et al.* 2002).

Tres características estructurales son importantes para su capacidad antioxidante: a) la presencia en el anillo B de la estructura catecol; b) la presencia de un

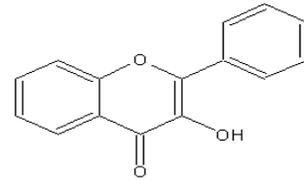
doble enlace en posición 2 y 3; c) la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La Quercetina, uno de los flavonoides más comunes, presenta las tres características, mientras que la Catequina sólo presenta la segunda y la Diosmetina la primera (Taiz *et al.* 2002). A los flavonoles y flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C<sub>3</sub> y con menor frecuencia al C<sub>7</sub> del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos azúcares son la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula de flavonoides se denomina aglicona (Martínez-Flórez *et al.* 2002).



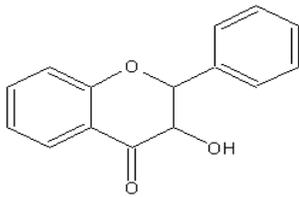
**Figura 2.-** Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración



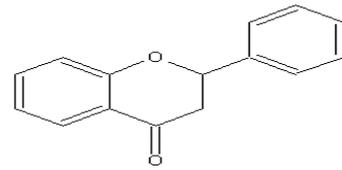
Flavona



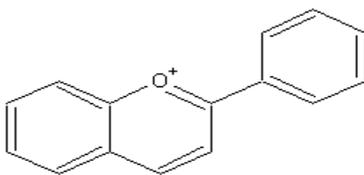
Flavonol



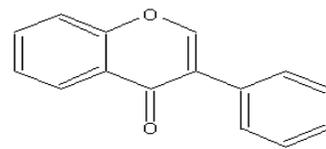
Flavanonol



Flavanona



Antocianina



Isoflavonoide

**Figura 3.-** Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

La forma más común de encontrar los flavonoides es como glicósidos, lo que permite aumentar su solubilidad en agua, así un grupo ester metilo o unidades isopentilo modificadas hacen al flavonoide lipofílico. Diferentes tipos de flavonoides desempeñan muy diferentes funciones en las plantas, tales como pigmentación y defensa. Responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación vegetal. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, además, confieren coloración, lo que puede contribuir a la polinización de las flores (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima en 23 mg/día, siendo la Quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día (Martínez-Flórez, *et al.* 2002).

Los flavonoides tienen acción benéfica sobre numerosos procesos fisiológicos del cuerpo humano, otorgan beneficios sobre el corazón, vasos sanguíneos, hígado, sistema inmune, tejido conectivo, glándulas adrenales, riñones, musculatura y sistema nervioso. Pueden actuar como antioxidantes (Ho *et al.* 1992), antialérgicos y antiinflamatorios (Ferrandiz *et al.* 1991), inmunoestimulantes, antihepatotóxico, antineoplásico (Yang *et al.* 1993) e hipoglicemiante, además de otras numerosas acciones incluyendo estabilización de la permeabilidad capilar (Lagrué *et al.* 1981).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como

hierro, cobre, zinc, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, ulcera estomacal y duodenal e inflamaciones (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

Un número creciente de sustancias naturales se han identificado como moduladores del proceso de carcinogénesis; entre ellas se encuentran los flavonoides que han demostrado poseer efectos antimutagénicos y anticancerígenos. Diversos datos experimentales han demostrado su acción antiproliferativa y anticarcinogénica y su papel como agente quimiopreventivo (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

### **2.3.- Pigmentos fotosintetizadores (Carotenoides, Clorofila)**

Los carotenoides se identificaron por primera vez hace 150 años, al descubrirse la naturaleza química del pigmento amarillento, luteína, que hace que las hojas de los árboles cada otoño nos ofrezcan su dorada apariencia (Lozano, 1997).

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides formados por ocho unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ), es decir, moléculas de 40 átomos de carbono con un sistema de dobles enlaces conjugados lo que otorga intensos colores. Estos compuestos son derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranil-pirofosfato, en su mayoría son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo ( $\beta$ -caroteno) y el rojo (licopeno). Se encuentran unidos a proteínas mediante enlaces no covalentes. Estos pigmentos naturales liposolubles se encuentran en los vegetales, debido a que el ser humano no es capaz de sintetizarlos, estos deben ser adquiridos por medio de la dieta. Se encuentran en hojas en donde se

enmascara la coloración amarilla, anaranjada y roja que dan estos pigmentos, por el color de la clorofila dando coloración verde oscura, también se encuentran en frutas y órganos subterráneos coloreados (Matos *et al.* 2002).

En plantas y algas los carotenos se encuentran en las membranas tilacoides de los cloroplastos. La regulación de la carotenogénesis está estrechamente unida al metabolismo de la clorofila, a la reorganización de las estructuras de membrana y a la estimulación lumínica. Son pigmentos accesorios en la fotosíntesis, captando energía luminosa en regiones del espectro donde la clorofila no absorbe eficientemente. Además protegen de la luz intensa que puede dañar la clorofila e inactiva las especies reactivas de oxígeno o directamente al estado triplete de la clorofila (Stryer, 2002).

En los animales y en el hombre, al ingerirlos en la dieta, también cumplen funciones antioxidantes, además de jugar un rol fisiológico importante en la visión. Entre los más comunes y ligados a un efecto saludable, están el alfa y beta caroteno ( $\beta$ -caroteno), licopeno, luteína, zeaxantina y criptoxantina a los que se les denomina, como grupo, carotenoides mixtos, presentes fundamentalmente en frutas y algunos vegetales (Fig.4) (Lozano, 1997).

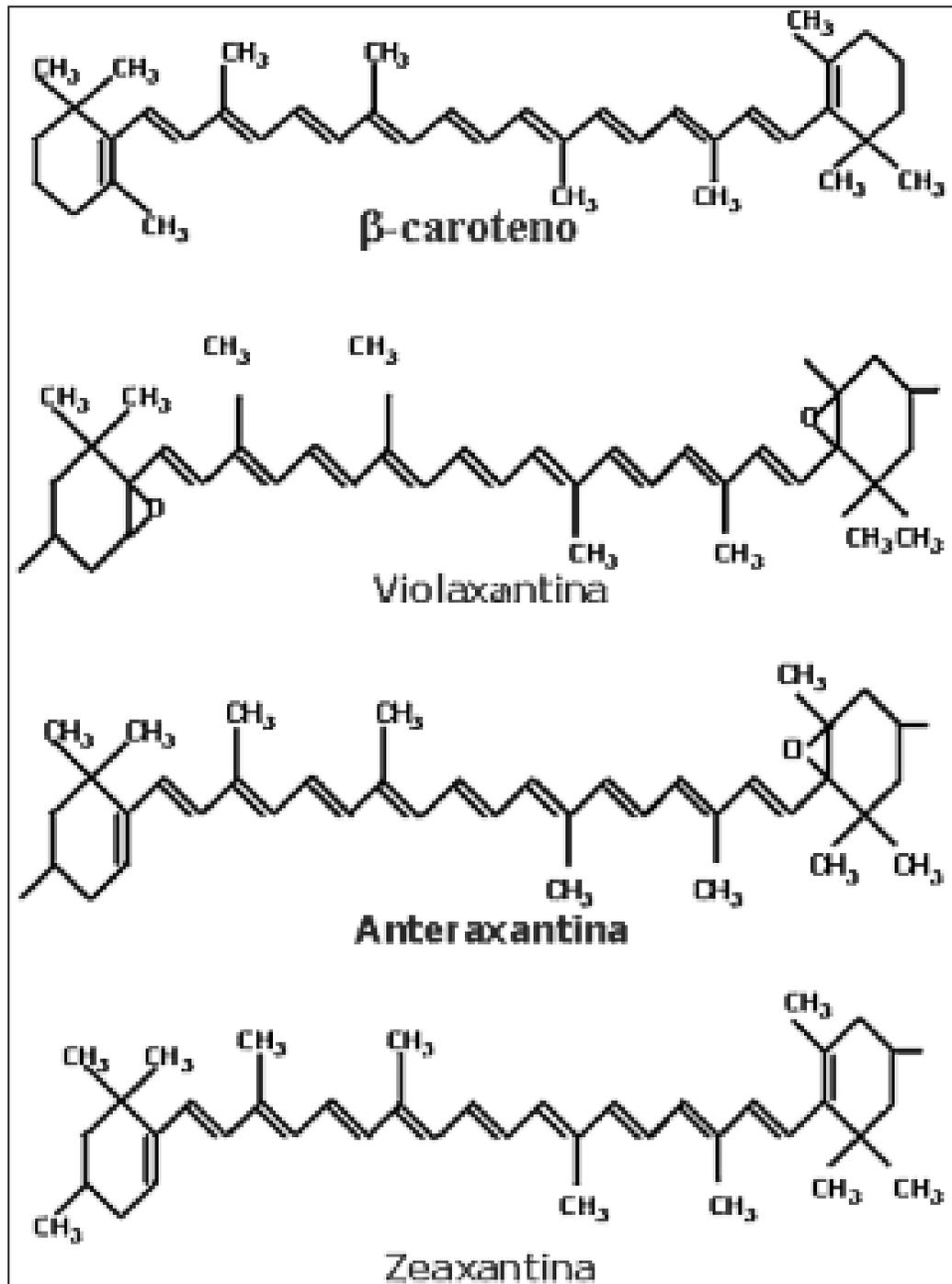


Figura 4.- Estructuras de algunos carotenoides.

Los alfa y beta carotenos precursores de la vitamina A o retinol, esencial en el proceso de la visión, actúan como nutrientes antioxidantes. Son los únicos carotenoides que se transforman en cantidades apreciables de vitamina A. Sin embargo el organismo sólo convierte estos carotenoides en vitamina A conforme los va necesitando. Los carotenos son importantes para el sistema inmune, y necesarios para el mantenimiento y desarrollo de un tejido epitelial saludable y de membranas mucosas del revestimiento de pulmones, bronquios y otros tejidos respiratorios. Recientemente se ha prestado mucha atención a la familia completa de los carotenoides incluyendo alfa caroteno, luteína, licopeno, zeaxantina y capxantina. Las investigaciones han demostrado que algunos de estos carotenoides proporcionan beneficios antioxidantes y protectores significativamente superiores al beta caroteno (Fuertes, 2005).

En estudios epidemiológicos recientes se ha demostrado una asociación entre niveles elevados de carotenoides en la dieta o en sangre y un efecto protector contra el desarrollo de enfermedades crónicas como ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades degenerativas de la mácula y cataratas. Este hecho, sumado a la función de algunos de estos compuestos como precursores de la vitamina A provoca un interés creciente (Matos *et al.* 2002). Por ello, estos últimos años, se han incorporado en las presentaciones farmacéuticas de vitaminas y minerales el  $\beta$ -caroteno, e incluso mezclas de carotenoides incluyendo criptoxantina, luteína y zeaxantina. Todo esto con el fin de acercarse lo más posible a como estos carotenoides se presentan en la naturaleza, ya que se ha comprobado que la mezcla de estos, en frutas y verduras, está asociado a un menor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades de tipo degenerativas (Fuertes, 2005).

En general, los carotenos se consideran seguros, basándose principalmente en los estudios sobre  $\beta$ -carotenos. Un mayor consumo de ellos puede hacer que la piel adquiera un tono anaranjado o amarillento. Esto no tiene ningún efecto perjudicial ni ninguna relación con la ictericia. Pero, mientras no exista mayor información al respecto, no es conveniente, y sobre todo en caso de fumadores, utilizar suplementos de  $\beta$ -caroteno sintético. Algunos estudios clínicos doble ciego recientes, demuestran que los suplementos de  $\beta$ -caroteno, pueden aumentar el riesgo de cáncer de pulmón. Además, tres de cuatro estudios preclínicos, realizados en ratas demostraron pequeños aumentos en el riesgo de enfermedades cardíacas en aquellas que se les administró  $\beta$ -caroteno sintético en comparación con las que tomaron placebo (Fredmeyer, 2004).

Un estudio de Karnaukhov (1990) informó que los carotenos y en especial los  $\beta$ -carotenos son capaces de inhibir la fotocarcinogénesis por radiación UV en animales, mediante un mecanismo de atrapamiento de oxígeno que disminuye la oxidación y ruptura de las cadenas de queratina del estrato córneo de la piel e impide que dicha radiación penetre a capas más profundas y afecte las células. Curran-Celentano (1996) señala, en su estudio sobre la función que cumplen carotenoides como luteína y zeaxantina en la visión, que personas con degeneración macular, donde la capa de la retina compuesta por estos carotenos era más delgada, estaba relacionado con la menor ingesta de carotenoides. Ello corrobora otros estudios epidemiológicos previos, indicativos que las personas más consumidoras de frutas y verduras ricas en luteína y zeaxantina, presentan menos riesgo de sufrir cataratas y degeneración macular asociada a la edad (Lozano, 1997).

Así como en el cloroplasto se encuentran los carotenos, allí también se ubica la clorofila, específicamente en las membranas tilacoides. La clorofila es un pigmento de color verde que presenta estructuras policíclicas planas, formada por 4 anillos pirrólicos unidos por medio de puentes de metilo ( $--CH=$ ) lo que constituye una porfirina. La posición central está ocupada por  $Mg^{2+}$ , el anillo IV está esterificado con un alcohol (fitol) cadena de 20 átomos de carbono con un doble enlace ( $C_{20}H_{39}OH$ ) (Fig.5 A) (Stryer, 2002).

La clorofila tiene como función captar luz de longitudes de onda 400 a 700 nm, absorbe todas las longitudes de onda de la luz visible excepto el verde, el cual es reflejado. Al incidir la luz en una molécula de clorofila, ésta transfiere su excitación en forma de energía para reacciones de biosíntesis. En suma la transformación de energía lumínica en energía química (Lozano, 1997).

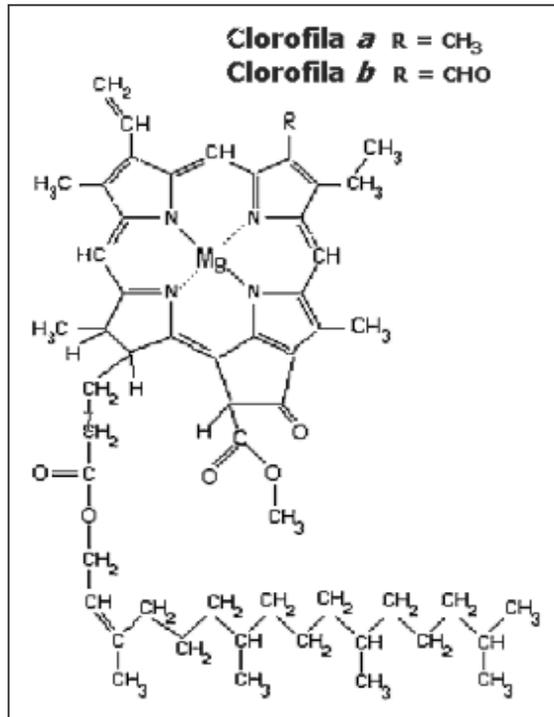
Diversos autores consideran que la clorofila, de estructura similar a la hemoglobina humana, es absorbida directamente por la sangre a través del sistema linfático. Una vez en el torrente sanguíneo activa el metabolismo celular, mejora la defensa, resistencia y capacidad regeneradora de las células así como su respiración, por todo esto la clorofila se le han demostrado capacidad antianémica (Arnau, 2005). Se le ha comprobado además, que reduce la incidencia de cáncer hepático al disminuir los efectos perjudiciales de las aflatoxinas sobre el DNA (Lozano, 2005).

En general los cloroplastos contienen tanto clorofila *a* como clorofila *b* pero la mayoría contiene el doble de clorofila *a* que de *b*. Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región PAR

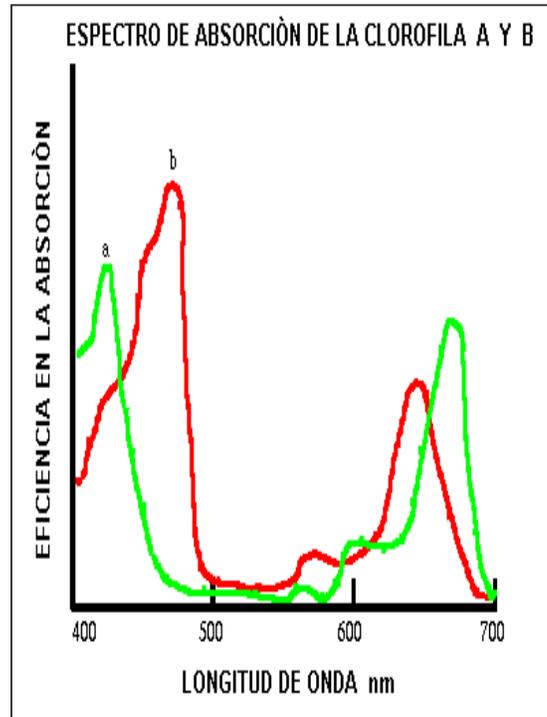
(Radiación Fotosintéticamente Activa) (Fig.5 B) (Stryer, 2002. Hernández, 2001). Desde un punto de vista químico es el radical fitol el responsable de la característica cerosa de la clorofila y explica su solubilidad en solventes orgánicos y su insolubilidad en agua (Hernández, 2001).

En investigaciones realizadas en plantas arbóreas nativas del sur de nuestro país, tratadas bajo un suplemento de radiación UV-B ambiental, se ha encontrado que la concentración de pigmentos fotosintéticos es mayor en las plantas tratadas respecto a su control. Es así como en *Laurelia sempervirens* se encontró un incremento de +12,6% de  $\beta$ -caroteno, +30,8% de clorofila *a* y +22,7% de clorofila *b* en plantas tratadas (Carvajal, 2005).

Teniendo en cuenta que *Aextoxicon punctatum* es una especie nativa abundante en los bosques del centro-sur de nuestro país, y que no se utiliza en la medicina popular, resultaría interesante investigar la presencia de sustancias biológicamente activas, como pigmentos (carótenos, flavonoides) con acción benéfica sobre la salud humana y el efecto que tendría sobre éstos la radiación ultravioleta B.



A



B

**Figura 5.-** Estructura de clorofila *a* y *b* (A), y su absorción en la región fotosintéticamente activa (PAR) (B).

## **Hipótesis de trabajo**

La concentración de pigmentos (protectores y fotosintéticos) en plántulas de *Aextoxicon punctatum* “Olivillo” expuestas a radiación UV-B, es mayor que en aquellas exentas de ésta radiación, y dependiente de la dosis de radiación y del tiempo de aplicación.

## **Objetivos generales**

- Identificar los pigmentos foliares de plántulas de *A. punctatum* mantenidas bajo radiación UV-B (tratadas) y en ausencia de esta radiación (control).
- Analizar el efecto de la dosis de radiación aplicada y el tiempo de tratamiento, en el tipo y concentración de pigmentos respecto al control.

## **Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la dosis de radiación UV-B en la respuesta cualitativa y cuantitativa de pigmentos protectores y fotosintetizadores.
- Identificar, mediante cromatografía de capa fina, los sustituyentes glúcidos de flavonoides encontrados.
- Investigar en la literatura, el efecto antioxidante de los flavonoides identificados.

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- Material vegetal y características generales

El efecto de la radiación UV-B en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y absorbedores se estudió en plántulas de Olivillo (*Aextoxicon punctatum*) de 6 meses de edad, provenientes de invernadero y mantenidas en bolsas de polietileno, conteniendo 1 Kg de tierra de hojas y suelo previamente cernido.

*Aextoxicon punctatum* (Ruiz et Pav) (Olivillo, Tique) es un árbol endémico de los bosques de Sudamérica austral, único representante de la familia endémica *Aextoxicaceae*. Es una especie arbórea nativa del sur de Chile. Este espécimen crece en la precordillera andina, es muy abundante dentro el bosque chileno, por ser el clima templado el más adecuado para su crecimiento. Es un árbol siempreverde de 20 a 25 m de altura y su tronco puede alcanzar un diámetro de 1 m aproximadamente. Posee una corteza gris clara y lisa con algunas vetas rojizas. Sus mayores dimensiones las alcanza a la edad de 60 años. Presenta hojas oblongo-lanceoladas, de borde entero, de 4 a 9 cm de largo y 2 a 3 cm de ancho, con característicos pelos escamosos de color café rojizo (Hoffmann, 1997). Es una especie dioica, en donde las flores masculinas y femeninas se encuentran en pies diferentes. Las flores van dispuestas en racimos axilares laxos y cortos. Los botones machos se encuentran cubiertos por una bráctea globosa (órgano con aspecto de hoja) que cae al abrir la flor. La flor femenina posee pétalos más pequeños o nulos, y rudimentos de estambres no fértiles, tiene ovario unilobular, estilo encorvado y estigma dividido en dos. El fruto es una drupa carnosa de color violeta, parecido a una aceituna pequeña (Hoffmann, 1997).

El Olivillo se desarrolla principalmente en climas marinos con temperaturas entre  $-3,2^{\circ}$  a  $31,3^{\circ}\text{C}$  como máximo y con precipitaciones que varían entre los 1044 a 2657 mm anuales (Montenegro *et al.* 2000).

### **3.1.1.- Lugar de trabajo**

Se trabajó durante los meses de Noviembre y Diciembre del 2005, bajo condiciones de laboratorio.

### **3.2- Tratamiento Ultravioleta tipo B (UV-B)**

Para evaluar el efecto de la radiación UV-B sobre el tipo y concentración de pigmentos (protectores y fotosintéticos), se utilizaron plántulas de Olivillo (*Aextoxicon punctatum*) expuestas a una dosis diaria de radiación UV-B (tratadas). Las plántulas control, permanecieron bajo condiciones de laboratorio considerado exenta de radiación UV-B (Fig. 6 B).

La dosis de radiación UV-B aplicada fue de  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 6 horas diarias, y fue aportada por 4 lámparas Philips Q-panel UV-B 313 (Hanna Instruments Neurtek), suspendidas a 25 cm de distancia sobre el ápice de las plántulas (Fig. 6 A).

Las plántulas (tratadas y control) se separaron en tres grupos de acuerdo al tiempo de radiación: 2, 4 y 6 semanas, cosechándolas al término de cada período.



**Figura 6.-** Cámara de tratamiento de radiación UV-B bajo condiciones de laboratorio: A) plántulas de *A. punctatum* sometidas a incremento de radiación de  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 6 horas al día durante 2, 4 y 6 semanas respectivamente, y B) plántulas control exentas de radiación UV.

### **3.3.- Metodología**

#### **3.3.1.- Determinación de parámetros fisiológicos**

Con el objetivo de determinar el efecto que ejerce la radiación UV-B sobre las plántulas de Olivillo, y la capacidad de adaptación y resistencia de éstas frente al estrés lumínico, se procedió al término de cada período de tratamiento UV-B, a realizar la cosecha de las plántulas haciendo un registro de altura total (tallo más raíz), número de hojas y peso fresco de hojas, tallo y raíz. De las hojas frescas se eligió al azar algunos ejemplares para realizar mediciones de la histología foliar, y aproximadamente 2 gramos de hojas frescas para su análisis químico.

El resto del material fresco se secó en estufa a 70°C hasta obtención de peso constante (Peso Seco). Del peso total (fresco y seco) se obtuvo matemáticamente biomasa y contenido hídrico.

#### **3.3.2.- Determinación del contenido hídrico total**

El agua es un componente esencial para las reacciones químicas, sirviendo a la planta como disolvente y medio de transporte, participando en el mantenimiento de la turgencia de las plantas. Constituye alrededor del 60 a 90 % del peso fresco de los tejidos. El contenido hídrico de las plantas varía de acuerdo con la especie y órgano considerado, dependiendo de las condiciones ambientales.

Una forma simple de determinar el contenido hídrico consiste en establecer la diferencia gravimétrica entre Peso Fresco total (PF) y Peso Seco (PS) de órganos o tejidos de la planta. Para efectos prácticos y de cálculos se siguieron indicaciones del método de Steubing *et al.* (2002).

$$\text{Contenido hídrico} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100$$

La diferencia entre este porcentaje y el 100%, corresponde al porcentaje de Peso Seco (biomasa).

### **3.3.3.- Determinación de la estructura histológica de las hojas**

En virtud a que se ha demostrado que la radiación UV-B provoca cambios en la estructura de la hoja, se procedió al análisis de la anatomía foliar al término de cada uno de los períodos de tratamiento. Para esto, se realizaron cortes transversales a mano alzada (16 $\mu$  de grosor) de la lámina foliar de hojas frescas (control y tratadas), montándose preparaciones que fueron observadas en microscopio óptico (Carl Zeiss) con lente graduado (40x). En dichos cortes, se midió el grosor completo de la hoja, el grosor de la cutícula superior e inferior, y el de cada tejido: epidermis superior e inferior y parénquima en empalizada y esponjoso (n = 27).

### **3.3.4.- Determinación del contenido de cenizas**

El cálculo del contenido de cenizas en plantas permitiría determinar el estado nutritivo de éstas, es decir, el contenido de minerales en cada parte de la planta, ya sea aérea (hojas y tallo) o subterránea (raíz).

Al finalizar cada período de tratamiento, se procedió a la determinación del contenido de cenizas. Para ello, se tomaron muestras de 0,3 gramos de material seco (tallo y raíz), calcinándolo en mufla a 500°C por 5 horas. Se utilizaron tres muestras control y tres tratadas, de tallo y raíz, tomadas al azar. Las hojas no fueron utilizadas en

la determinación de este parámetro debido a que no se disponía de abundante material foliar y, que el método implica destrucción de éstas, se prefirió utilizar las hojas sólo para análisis químicos, siendo éste el tema central del presente trabajo.

### **3.3.5.- Determinación de pH y conductividad en suelo**

A través de mediciones de conductividad eléctrica y pH se obtiene en forma rápida y precisa información sobre la concentración total de componentes ionizados de la solución de suelo. Normalmente, una acidez extrema del suelo está asociada con una disminución de sales minerales y predominio de protones ( $H^+$ ) con una consecuente disminución del pH y disminución de la conductividad eléctrica. En sustratos alcalinos (o básicos) predominan los aniones  $OH^-$  sobre el  $H^+$ , lo que se traduce en aumento de pH. Mientras que en suelos neutros existe un equilibrio entre ambos. Referente a la conductividad, suelos básicos poseen un valor de conductividad eléctrica alta. La conductividad eléctrica de la solución de suelo presenta cambios a través del año, producto de la utilización de minerales por las plantas, de actividades microbianas y, por efectos del microclima (Steubing *et al.* 2002).

El pH influye en la disponibilidad de nutrientes. La descomposición de materia orgánica por microorganismos y la consecuente liberación de nutrientes, disminuye con la acidez del suelo, pudiéndose acumular elementos tóxicos, por ejemplo el aluminio. Normalmente el pH del suelo cambia con la profundidad, estando también sujeto a variaciones estacionales. En estudios de ecología vegetal es de especial interés conocer el valor pH del suelo en la zona de desarrollo radicular (Steubing *et al.* 2002).

Para obtener valores comparables y reproducibles, tanto el pH como la conductividad del suelo, se determinan en suspensión de partículas sólidas de suelo y líquido. Para ello, luego de la cosecha de las plántulas, se extrajo suelo a 10 cm de profundidad de las bolsas de polietileno que contenían las plántulas control y tratadas, según indicaciones del método de Steubing *et al.* (2002). La determinación del pH del suelo se realizó mezclando 10 gramos de suelo con 25 ml de agua destilada. Del mismo modo, en otro matraz Erlenmeyer, se colocó igual cantidad de suelo junto a 25 ml de KCl (0,1N). Luego de agitar la solución durante 10 minutos, en agitador magnético (AROS 160), y dejar decantar lo que se encuentre en suspensión, se midió el pH en el sobrenadante.

Para la medición de la conductividad eléctrica del suelo, se procedió de acuerdo al método establecido por Steubing *et al.* (2002). Se tomaron 10 gramos de suelo en un matraz Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada, agitándose durante 30 minutos. La conductividad de la solución se midió en un conductómetro, previamente calibrado (KONDUKTOMETER CG 852). Tanto la medición del pH como de la conductividad eléctrica se realizó por triplicado.

### 3.4.- Reactivos empleados en análisis de pigmentos foliares

Para extracción y partición de pigmentos:

Solventes Merck calidad p.a: Metanol, éter de petróleo, acetato de etilo.

Para cromatografía de capa fina:

Solventes Merck calidad p.a: Piridina, acetato de etilo, ácido acético.

Cromatoplasmas de celulosa F (20 x 20 cm), espesor de capa 0,10 mm (Merck).

Solución reveladora: Oxalato de anilina.

Estándares:

Apigenina (Sigma).

Kamferol (Sigma).

Myricetina (Sigma).

Quercetina (Sigma).

L (+)- Arabinosa (Merck).

D (-)- Fructosa (levulosa) (Merck).

D (+)- Galactosa (Merck).

D (+)- Glucosa monohidratada (Merck).

Maltosa (Merck).

D – Manosa (Merck).

Rafinosa pentahidratada (melitosa) (Merck).

L (+)- Ramnosa monohidratada (Merck).

D (+)- Xilosa (Merck).

### **3.5.- Determinación de pigmentos foliares**

A fin de verificar el efecto que ejerce la radiación UV-B sobre los pigmentos foliares se analizó la concentración de  $\beta$ -caroteno, clorofila y de los diferentes tipos de flavonoides en plántulas tratadas respecto al control. Adicionalmente se estudió la presencia de flavonoides sintetizados por la plántula como respuesta al estrés UV-B, es decir, los UV-B dependientes.

Para el cumplimiento de este objetivo se realizó la extracción en hojas frescas inmediatamente después de realizada la cosecha. Los extractos fueron almacenados en frío (-20°C) para su posterior análisis.

#### **3.5.1.- Extracción de pigmentos foliares**

La extracción y separación de pigmentos foliares se llevó a cabo según indica el método Lichtenthaler y Willburn (1983) modificado. En esta etapa, para la obtención del extracto crudo de pigmentos foliares, se realizó extracción con metanol p.a en hojas frescas, seleccionadas al azar y pesadas. Para evitar foto-descomposición de los pigmentos, este proceso se llevó a cabo en ambiente oscuro iluminado con luz roja (700 nm). Las muestras por triplicado, se depositaron en mortero de vidrio, al cuál se agregó un volumen de 17 ml de metanol p.a, macerándose por un lapso de tiempo de 2 a 3 horas a temperatura ambiente. Luego utilizando pipeta pasteur, se procedió a extraer el sobrenadante, que contiene los pigmentos totales, el cual fue depositado en tubos de centrifuga cubiertos con papel de aluminio, los cuales se llevaron a centrifugación a una velocidad de 3500 rpm por un tiempo de 10 minutos. El sobrenadante, correspondiente al extracto crudo de pigmentos totales (fotosintéticos y protectores) se llevó a

espectrofotómetro de doble haz UNICAM (serie UV 500) (Fig.7) para obtener su espectro de absorción desde 200 a 750 nm, utilizando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las muestras se diluyeron 30 veces con metanol p.a, de modo de cumplir con la ley de Lambert-Beer.



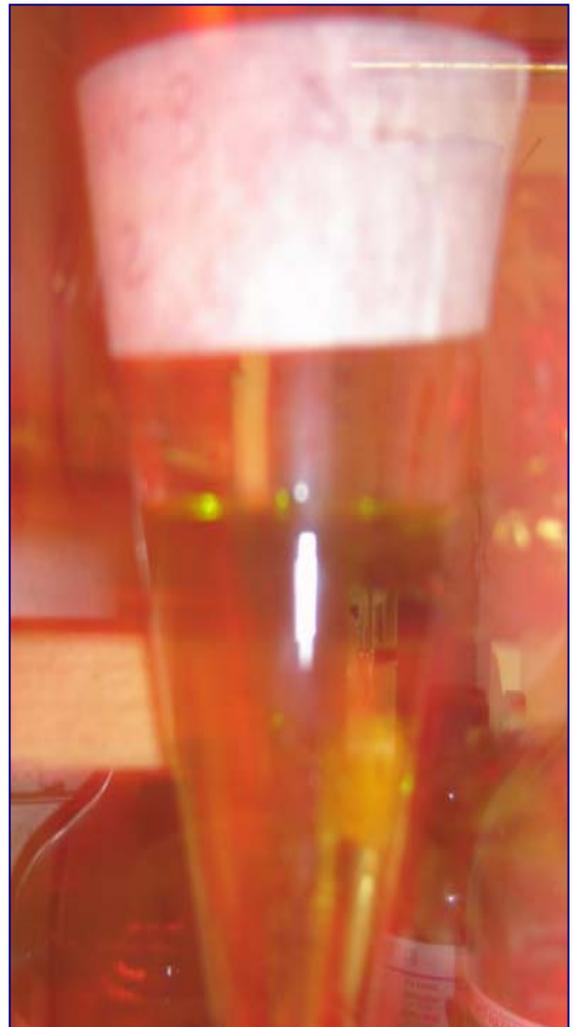
**Figura 7.-** Espectrofotómetro UNICAM (serie UV 500) usado en la identificación de pigmentos foliares, tales como: clorofila, carotenos y flavonoides.

### **3.5.2.- Separación de pigmentos foliares**

Con el fin de separar los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenos) de los protectores (flavonoides), el extracto crudo se depositó en embudos de decantación para la realización de extracción líquido-líquido agregando volúmenes iguales (10 ml) de metanol acuoso 40% y de éter de petróleo. Para evitar la formación de una emulsión, promoviendo la separación de las dos fases en cuanto a su polaridad, se agregó NaCl p.a. Luego el embudo cubierto con papel aluminio se agitó y dejó reposar durante 24 horas para que se produzca la separación de las fases (Fig.8 A). Así, en la fase etérea (fase superior) se encuentran carotenos y clorofilas, y en la fase alcohol-agua (fase inferior) se ubican los flavonoides (Fig. 8 B). Posterior a la recolección de cada fase, se llevó a medición de sus espectros para la obtención de sus absorbancias máximas. El espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos se observó alrededor de los 410 y 670 nm (Fig. 9) y el barrido de flavonoides entre 240 y 400 nm (Fig. 10)

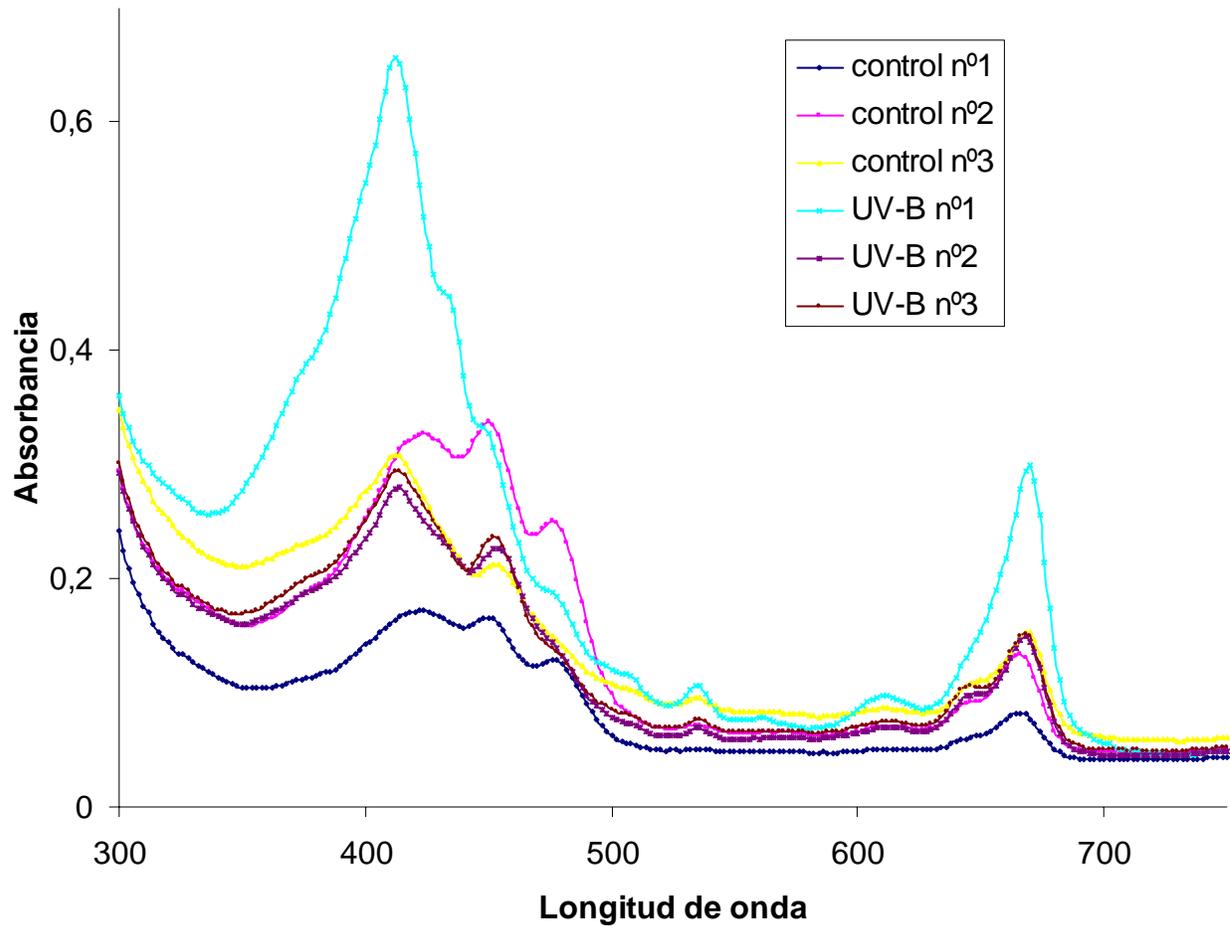


A

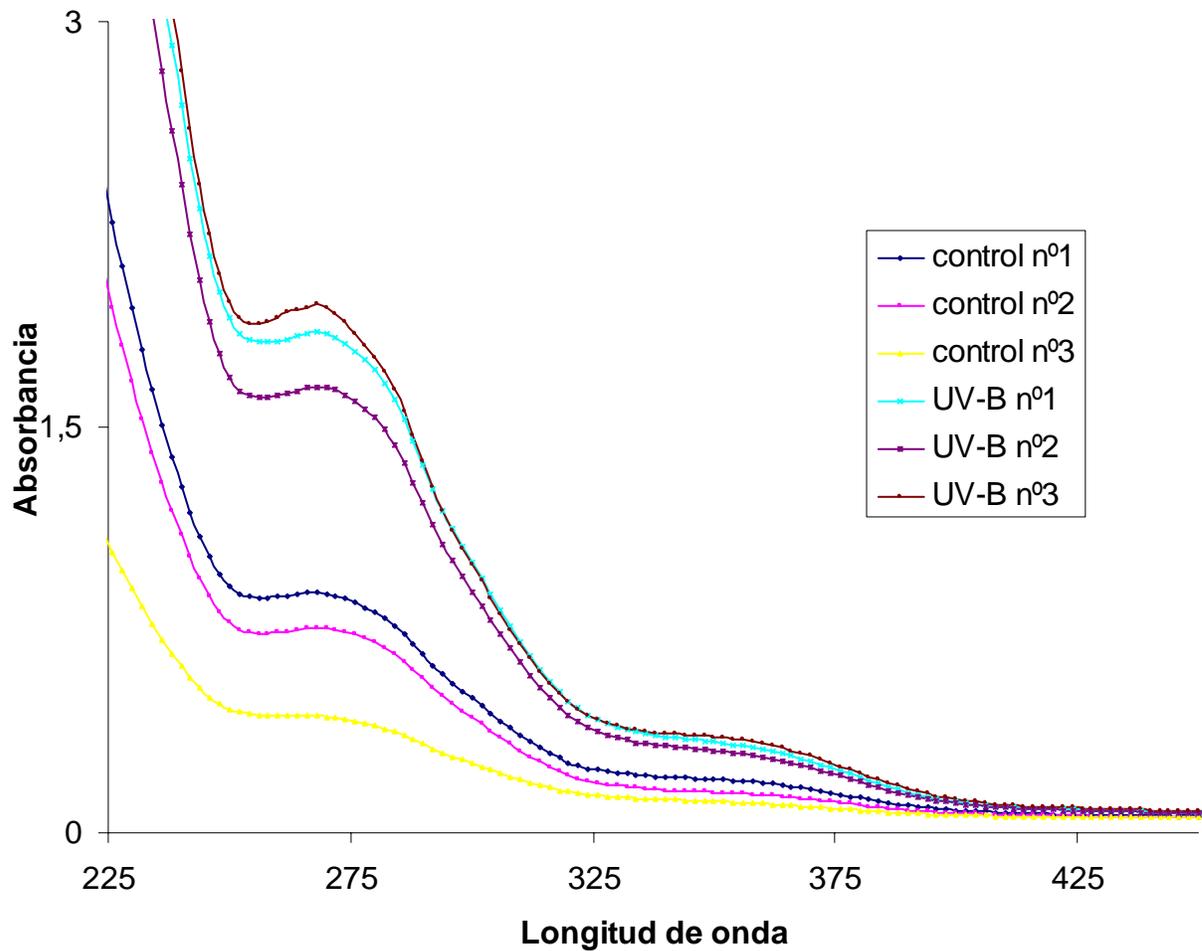


B

**Figura 8.-** Embudos de decantación cubiertos con papel aluminio, conteniendo el extracto crudo de pigmentos foliares (A). Separación de la fase etérea (superior) de color verde, con clorofila y carotenos y la fase agua - alcohol (inferior) de color amarillo, donde se encuentran los flavonoides (B).



**Figura 9.-** Espectros de absorción de carotenos y clorofilas (6ª semana) en fase etérea de extracto de hojas de *A. punctatum* tratadas  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  de radiación UV-B por 6 horas diarias durante 6 semanas de tratamiento (UV-B) y exentas de radiación (control). Mediciones para carotenos obtenidas a 410 nm de absorción máxima y para clorofilas totales a 666 nm.



**Figura 10.-** Espectro de absorción de flavonoides (6ª semana) en metanol 40%, en extractos foliares de plántulas de Olivillo aplicando  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  de radiación UV-B por 6 horas diarias durante 6 semanas de tratamiento (UV-B) y exentas de radiación (control). Se observan picks de absorción máxima a 270 nm.

### 3.5.3.- Hidrólisis de flavonoides

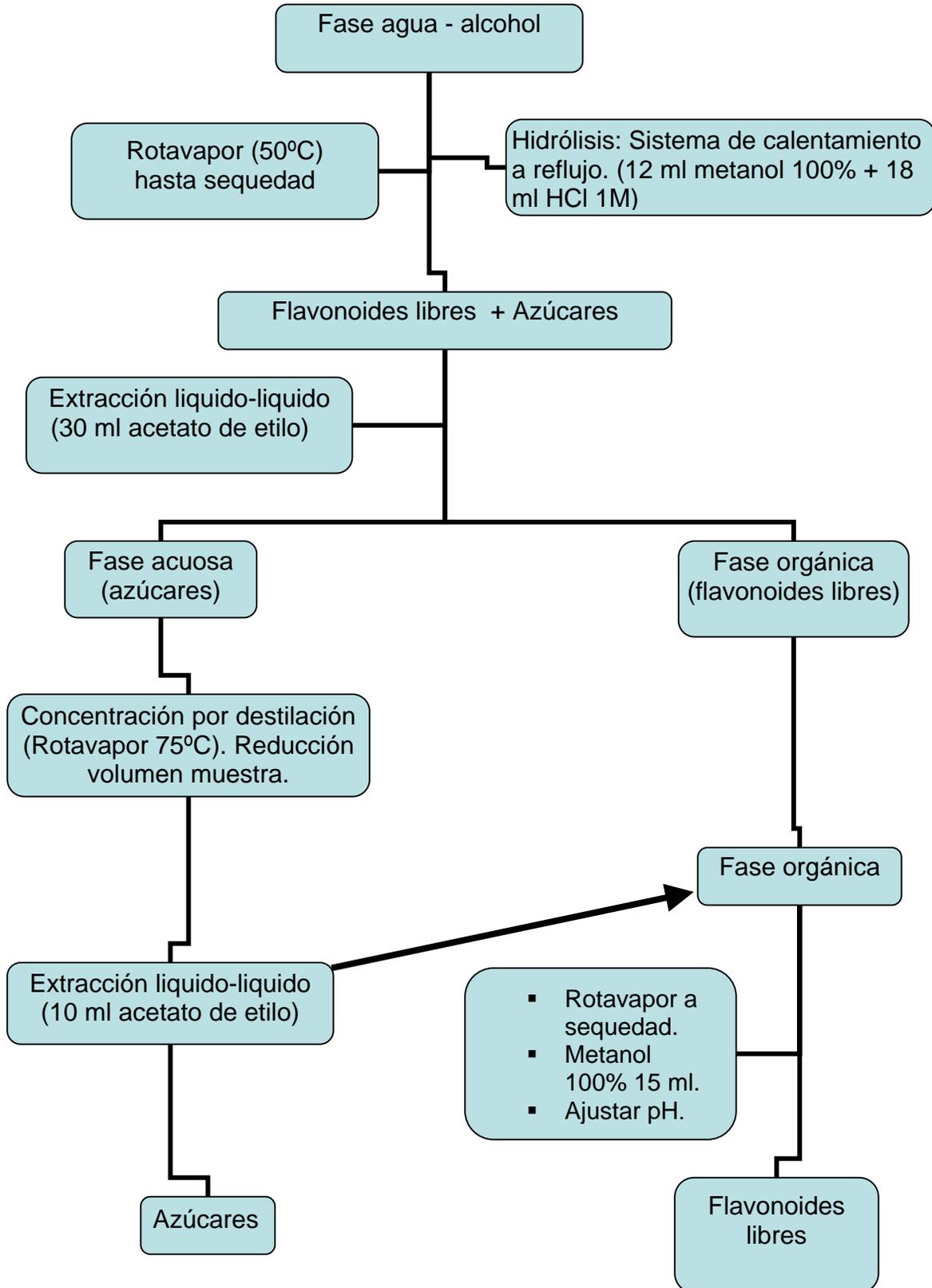
En estado natural los flavonoides se encuentran unidos a moléculas de azúcares, estos actuarían como coadyuvantes a las propiedades antioxidantes del flavonoide, confiriéndole además propiedades hidrofílicas. Por lo tanto, es importante determinar el tipo de azúcar presente en la molécula del flavonoide ya que el primero contribuiría grandemente a las propiedades del segundo, incluso en que el flavonoide sea mayormente absorbido en el organismo.

Con el objetivo de identificar flavonoides y azúcares presentes, la fase alcohol-agua fue sometida a hidrólisis ácida para separarlos. Para lo cual dicha fase se llevó a sequedad en rotavapor a 50°C durante aproximadamente 10 minutos. La hidrólisis fue llevada a cabo agregando al matraz, con la muestra en estado sólido, 18 ml de HCl 1M y 12 ml de metanol 100%, y luego a sistema de calentamiento a reflujo durante 2 horas. Al término de dicho tiempo, se dejó enfriar y se sometió a extracción líquido-líquido mediante embudo de decantación con acetato de etilo (30 ml). Se agitó y dejó en reposo por un lapso de 15 minutos, obteniéndose separación completa de las fases (orgánica y acuosa). La fase orgánica contiene los flavonoides y la fase acuosa los azúcares. Para evitar la posible pérdida de flavonoides en la fase acuosa, se procedió a concentrar esta fase mediante destilación por rotavapor a temperatura de 75°C. Luego, la solución reducida a la mitad de su volumen inicial, se llevó nuevamente a extracción líquido-líquido con un volumen 10 ml de acetato de etilo (Fig. 11).

La fase orgánica, obtenida de la primera y segunda extracción, se llevó a sequedad en rotavapor para posteriormente agregar 15 ml de metanol 100% y llevar a lectura a espectrofotómetro. Antes de leer el espectro de los flavonoides hidrolizados,

se ajustó el pH hasta aproximadamente 4,6 agregando NaOH 0,1 M. Las muestras de flavonoides hidrolizadas fueron leídas en longitud de onda entre 200 y 500 nm para observar el desplazamiento de bandas que ocurre producto de la hidrólisis (Fig. 21).

La fase acuosa final se almacenó en frío a  $-5^{\circ}\text{C}$ , para realizar análisis posterior de modo de poder identificar el o los azúcares presentes. La identificación de los azúcares se realizó mediante técnica TLC.



**Figura 11.-** Hidrólisis y separación de azúcares de los flavonoides.

### 3.5.4.- Determinación de pigmentos fotosintéticos

La determinación de clorofila y carotenoide se realizó en base a las absorbancias obtenidas en la fase etérea en espectrofotómetro a longitudes de onda de 666 y 653 para clorofila y 410 nm para carotenoide, utilizando éter de petróleo como blanco.

Para el cálculo de las concentraciones, se utilizaron las siguientes fórmulas (Lichtenthaler y Willburn, 1987) modificado:

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml de extracto}) = 12,25 \times A_{666} - 2,79 \times A_{653}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/ml de extracto}) = 21,50 \times A_{653} - 5,10 \times A_{666}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/ml de extracto}) = \frac{1000 \times A_{410} - 1,82 \times \text{Chl a} - 85,02 \times \text{Chl b}}{198}$$

198

Siendo A la absorbancia a la longitud de onda señalada.

### **3.5.5.- Utilización cromatografía de capa fina en la identificación de flavonoides y sus azúcares sustituyentes.**

La cromatografía de capa fina, es una técnica de análisis de laboratorio relacionada con el HPLC. Si bien ambas técnicas son experimentalmente diferentes, el principio de la separación y la naturaleza de las fases son las mismas. Debido a la reproducibilidad de las capas y a las concentraciones medidas, TLC (Thin Layer Chromatography) es usado como un método de análisis cualitativo y en la actualidad, cuantitativo gracias a los instrumentos incorporados a esta técnica. El desarrollo de sembradores automáticos de muestras y a densitómetros, ha inducido actualmente la nano-cromatografía de capa fina (nano-TLC), una técnica simple con alta capacidad de detección (Rouessac *et al.* 2000).

La separación de componentes de una muestra usando TLC, es realizada sobre una placa rectangular de vidrio, plástico o aluminio, utilizada como soporte. Las placas son revestidas con una fina película (100 - 200  $\mu\text{m}$ ), usualmente sílica gel, alúmina, poliamida o celulosa, denominada fase estacionaria (Rouessac *et al.* 2000).

Con el objetivo de realizar una separación, la muestra es depositada alrededor de 1 cm sobre el borde inferior de la placa. El volumen de la muestra es pequeño (alrededor de  $\text{nl}$  o  $\mu\text{l}$ ) formando una pequeña mancha de aproximadamente 1-3 mm de diámetro. El depósito o sembrado de la muestra puede ser automático o manual utilizando un capilar. La placa es depositada dentro de una cámara de vidrio cubierta. Ésta contiene en su interior la fase móvil, la cual está en contacto con la placa a una profundidad de pocos milímetros (Rouessac *et al.* 2000).

La fase móvil migra por capilaridad a través de la fase estacionaria, induciendo la migración diferencial de los componentes de la muestra. La distancia de migración depende del tamaño de la partícula, polaridad, grado de interacción con la fase estacionaria y de la naturaleza de la fase móvil, entre otros (Domínguez, 1975). Posteriormente se revela la placa, observándose compuestos coloreados de detección inequívoca o compuestos incoloros. Para estos últimos existen distintas técnicas de revelado como; sales en spray, carbonización con agentes corrosivos, exposición de la placa bajo lámpara de luz ultravioleta, radioluminiscencia, entre muchos otros (Rouessac *et al.* 2000).

La identificación de las manchas se realiza comparando la migración de éstas con la de compuestos de referencia autenticados. En TLC cada componente es definido por su valor de Rf (relación del flujo o factor de retención), que corresponde a su migración relativa comparado con el solvente (Clark *et al.* 1988):

$$R_f = \frac{\text{Distancia de migración de la muestra}}{\text{Distancia de migración del solvente}} = \frac{X}{X_0}$$

Para la identificación de componentes en un extracto natural, se elige tanto la fase estacionaria como la móvil, dependiendo del tipo de sustancia natural a analizar. Las dos fases obtenidas (fase acuosa y fase orgánica) (Fig. 11) se analizaron cualitativamente usando TLC ascendente a temperatura ambiente y con solvente Metanol: Acetato de etilo (5:1) y Piridina: Acetato de etilo: Ácido acético: Agua (6:6:1:3), para flavonoides y azúcares respectivamente. Con respecto a la fase estacionaria se usaron placas de poliamida para solución de flavonoides y celulosa para identificar azúcares.

Para revelar y obtener los Rf de muestras de flavonoides se utilizó lámpara de luz Ultravioleta Multiband UVSL-25 Mineral Light (200 – 400 nm de longitud de onda), mientras que para azúcares se utilizó revelador líquido pulverizado de Oxalato de anilina, preparado en el momento (Anexo 3).

### **3.5.6.- Identificación de flavonoides.**

Para determinar el tipo de flavonoide sintetizado por efecto de la exposición a un exceso de radiación UV-B en las plántulas de *A. punctatum*, se procedió a establecer mediante comparación de los valores Rf obtenidos de las muestras control y tratadas, con Rf obtenidos de estándares puros en metanol 100%, el o los tipos de flavonoides presentes.

### **3.5.7.- Identificación de azúcares.**

Con el objetivo de determinar el tipo de azúcar presente en la molécula de flavonoide, y de establecer el efecto que ejerce el estrés de radiación UV-B en la síntesis de éstos en las plántulas de Olivillo, se llevó a cabo la identificación de azúcares.

Para ello se determinaron las distancias de migración ( $R_f$ ) de estándares puros de glúcidos y de las muestras, en metanol acuoso. A partir de los  $R_f$  obtenidos y por comparación de ellos, se logró identificar el tipo de azúcar presente en las muestras.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Determinación de parámetros morfológicos en *Aextoxicon punctatum*

#### 4.1.1.- Número de hojas

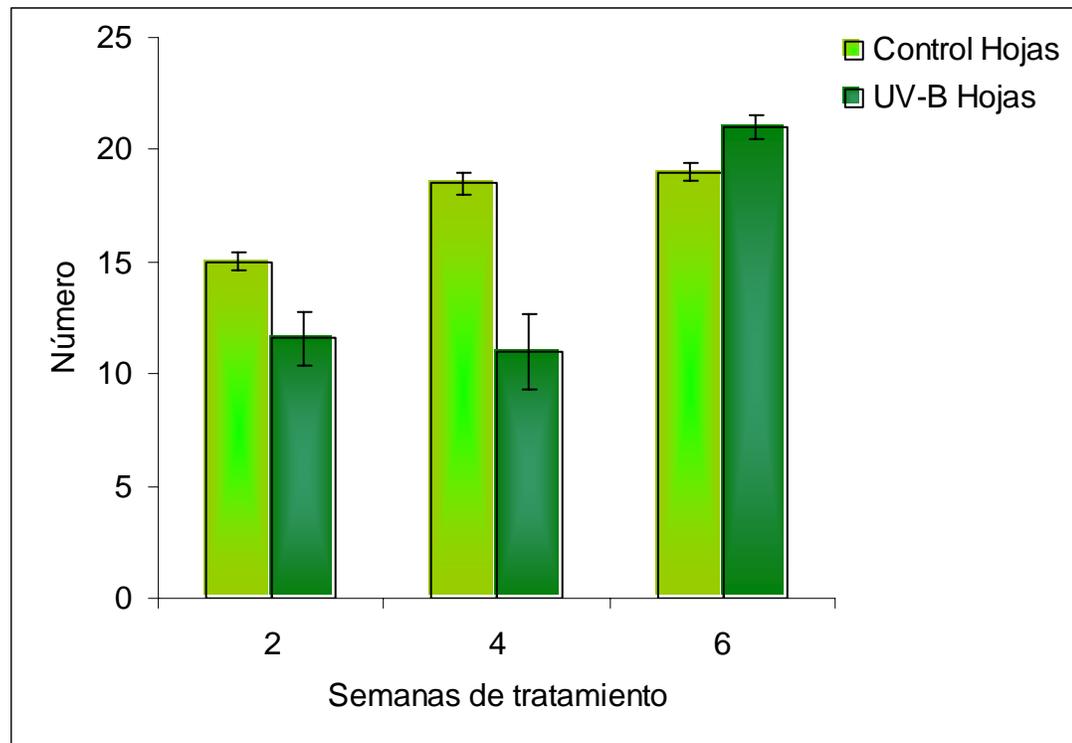
Para la determinación de este parámetro, al final de cada período de tratamiento se cosecharon las plántulas y contabilizaron el número de hojas. En la Figura 12 se muestra el efecto de la radiación ultravioleta y el período de tratamiento en el número de hojas en las plántulas de *A. punctatum*. El tratamiento UV-B provocó la caída de éstas durante la 2ª semana de tratamiento y especialmente la 4ª semana, alcanzando en ésta una diferencia de -40% respecto del control. Este valor es modificado al finalizar la semana 6, cuando el número de hojas de las plántulas tratadas es mayor (+10,52%) que el control.

#### 4.1.2.- Altura de tallo

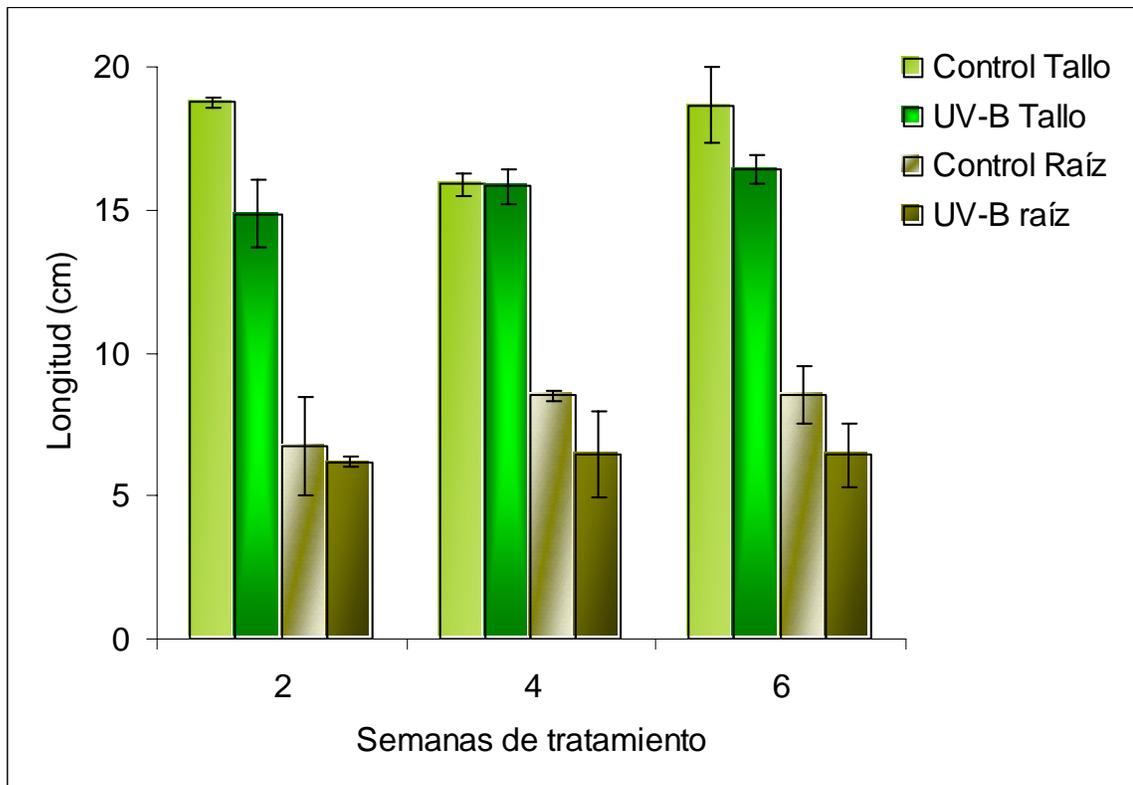
La disminución de la tasa de crecimiento del tallo (Fig.13) muestra una respuesta, al estrés UV-B aplicado, más intensa en la 2ª semana (-20% del control) disminuyendo esta diferencia hacia el final del período tratamiento (-12% respecto del control).

#### 4.1.3.- Crecimiento de raíz

Si bien la tendencia de crecimiento de raíz en las plántulas tratadas, se mantiene durante las 6 semanas de tratamiento (Fig. 13), la diferencia de su longitud respecto del control se incrementa hacia el final del tratamiento (-24.47% del control a la 6ª semana).



**Figura 12.-** Efecto del exceso de radiación UV-B en el número de hojas en plántulas de *A. punctatum* tratadas con  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 6 horas al día durante 6 semanas de tratamiento (UV-B), respecto de plántulas control exentas de radiación UV-B (control) ( $n = 7, \pm \text{SD}$ ).



**Figura 13.-** Efecto del exceso de radiación UV-B en la tasa de crecimiento de tallo y raíz en plántulas de *A. punctatum* tratadas con  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 6 horas al día durante 6 semanas de tratamiento (UV-B), respecto de plántulas control exentas de radiación UV-B (control) ( $n = 7, \pm \text{SD}$ ).

#### **4.1.4.- Histología de la hoja**

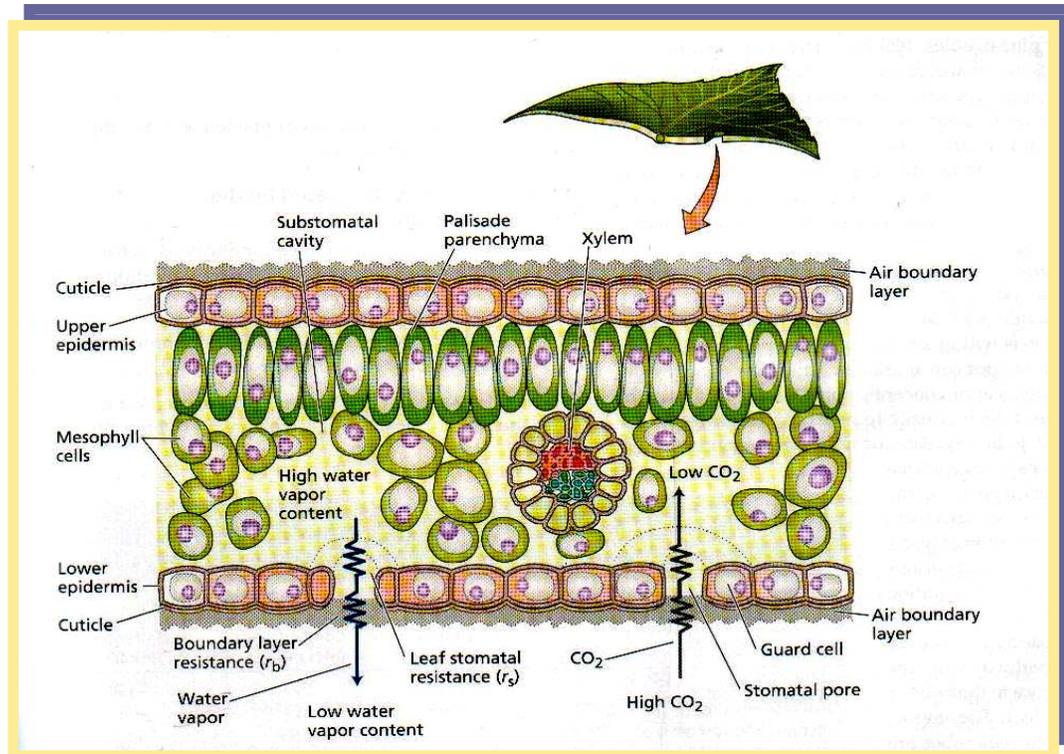
La radiación UV-B ejerce efectos sobre la estructura histológica de la hoja (Fig. 14) variando el grosor de las estructuras producto de cambios positivos y negativos en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos y protectores.

Las características estructurales de las hojas (controles y tratadas), así como el grosor de las cutículas y de sus tejidos se informan en la Tabla 1.

Se observa, que el grosor de ambas cutículas no varía, mientras tejidos como epidermis superior y parénquima esponjoso disminuyen en -8,33% y -14,36% respectivamente por efecto de la radiación UV-B. Contrariamente a lo esperado el grosor total de la hoja, disminuye en -17,75% a pesar que el grosor del parénquima en empalizada aumenta en +9,37%. El aumento del grosor de esta estructura se debería a un incremento en la concentración de cloroplastos los cuales se ubican a este nivel. Del mismo modo, la disminución observada del parénquima esponjoso, estaría relacionado con pérdida de contenido hídrico en plántulas tratadas bajo radiación UV-B.

**TABLA 1.** Parámetros morfométricos medidos en microscopio óptico en cortes transversales de lámina foliar de plántulas de *A. punctatum* mantenidas en condiciones de laboratorio (control) y bajo radiación UV-B (+UV-B) (n = 27, ± SD).

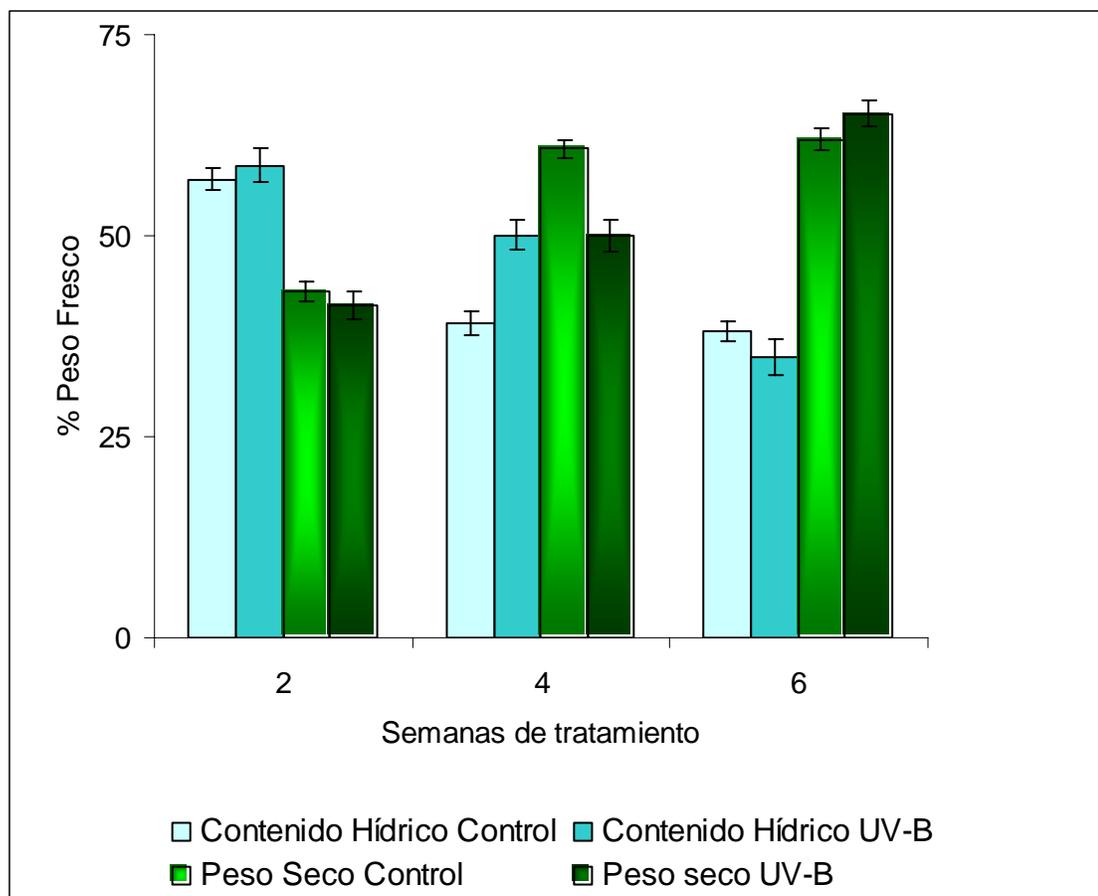
<b>Características anatómicas (µm)</b>	<b>Control</b>	<b>+UV-B</b>	<b>% variación</b>
<b>Cutícula adaxial</b>	3.57 ± 0	3.57 ± 0	0
<b>Epidermis superior</b>	14.28 ± 0	13.09 ± 1.68	-8.33
<b>Parénquima en empalizada</b>	57.12 ± 3.57	62.47 ± 8.9	+9.37
<b>Parénquima esponjoso</b>	101.74 ± 5.35	87.46 ± 8.9	-14.36
<b>Epidermis inferior</b>	10.71 ± 0	10.71 ± 2.91	0
<b>Cutícula abaxial</b>	3.57 ± 0	3.57 ± 0	0
<b>Grosor total</b>	201.11 ± 10.23	165.41 ± 8.41	-17.75



**Figura 14.-** Corte transversal de lámina foliar. En orden descendente, se observa: cutícula adaxial, epidermis superior, parénquima en empalizada, parénquima esponjoso, epidermis inferior y cutícula abaxial. (Extraído de Taiz *et al.* 2002).

#### 4.2.- Contenido hídrico y Biomasa

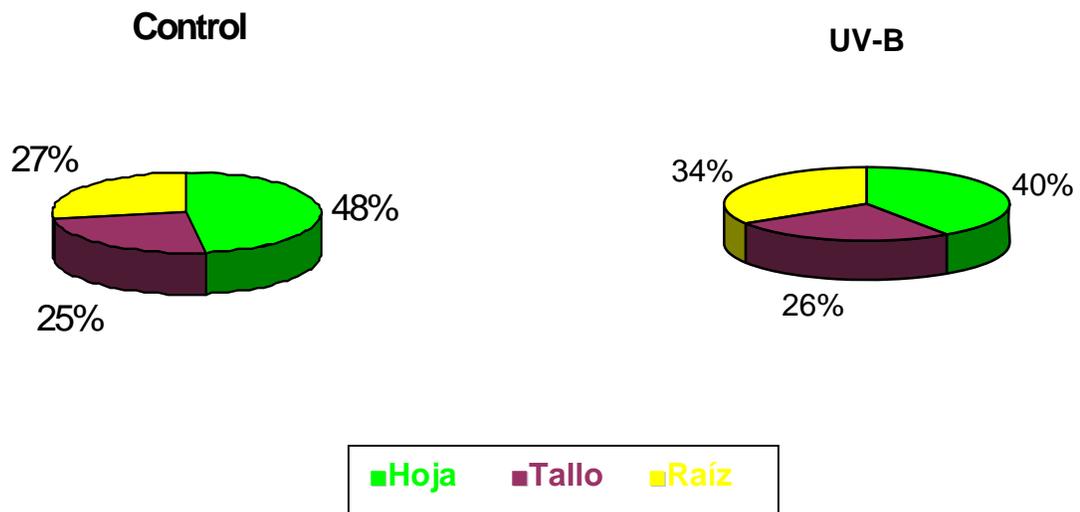
La biomasa total (gr. PS) de las plántulas (Fig. 15) se incrementó por efecto del tratamiento UV-B en +5,10% respecto de su control en la 6ª semana y aumentando de acuerdo a su contenido inicial (2ª semana) en +57,54%.



**Figura 15.-** Efecto de la radiación UV-B en el Peso Seco (%PF) y contenido hídrico (%PF) de plántulas de *A. punctatum*, al término de cada período de tratamiento (n = 24 ± SD).

#### 4.2.1.- Redistribución de biomasa

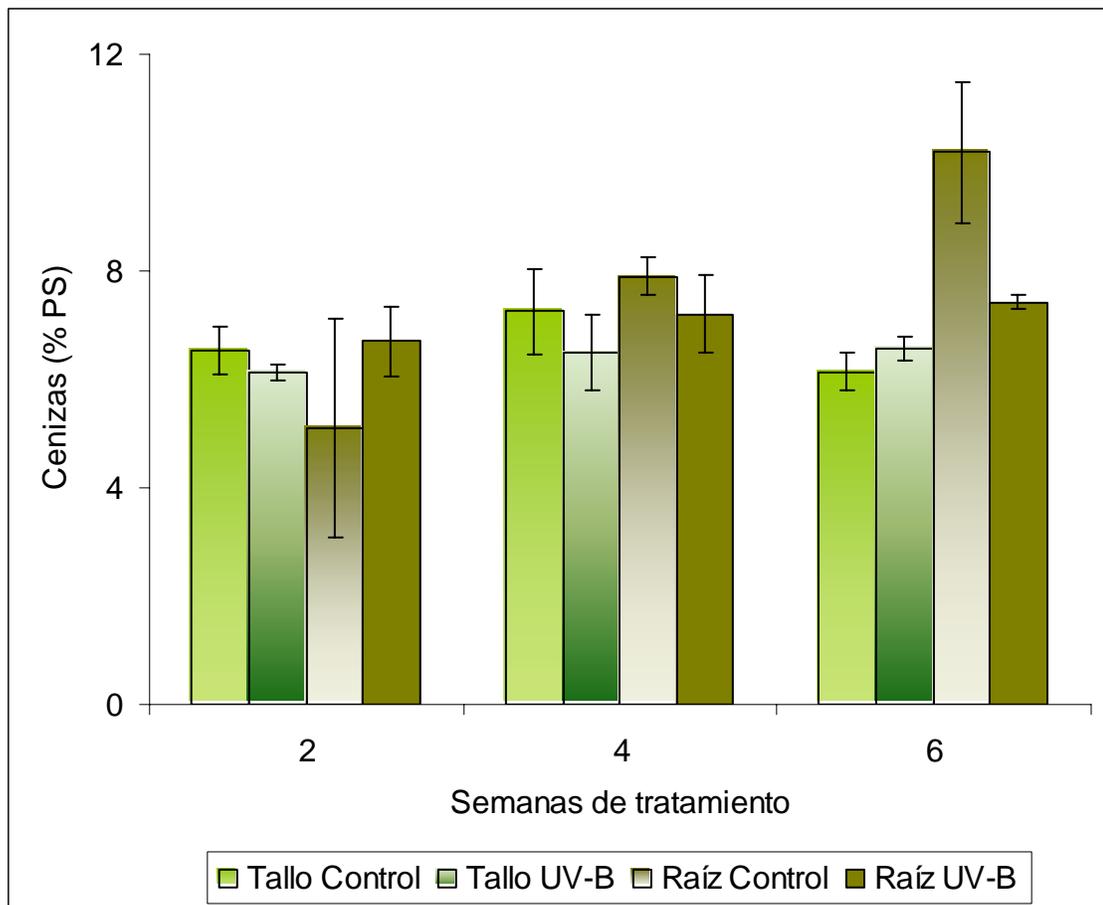
En la Figura 16 se representa el efecto de la dosis de radiación UV-B aplicada en los contenidos de biomasa de hoja, tallo y raíz medidas al finalizar el ensayo (6ª semana). La biomasa de tallo y raíz fue aumentada en un +1% y +7% respectivamente respecto de su control, a expensas de la biomasa de hoja que disminuyó en -8%, a pesar que el número de hojas se incrementó (FIG. 11).



**Figura 16.-** Redistribución de asimilados en 6ª semana de tratamiento, en plántulas de *A. punctatum*, mantenidas bajo radiación UV-B (UV-B) y en condiciones de laboratorio (control). Valores expresados en porcentaje del Peso Seco.

#### **4.3.- Contenido de cenizas**

La determinación de cenizas permite demostrar el contenido de nutrientes esenciales (materia inorgánica) presente en la planta e indirectamente refleja la capacidad que posee la raíz para obtener nutrientes disponibles en el suelo. En la Figura 17 se observa en general, tendencia al aumento hacia el final del período de tratamiento UV-B (6ª semana), específicamente un incremento de +7% en tallo. Evidenciándose una disminución respecto del control en la 6ª semana de -27,18% en el contenido de cenizas de la raíz.



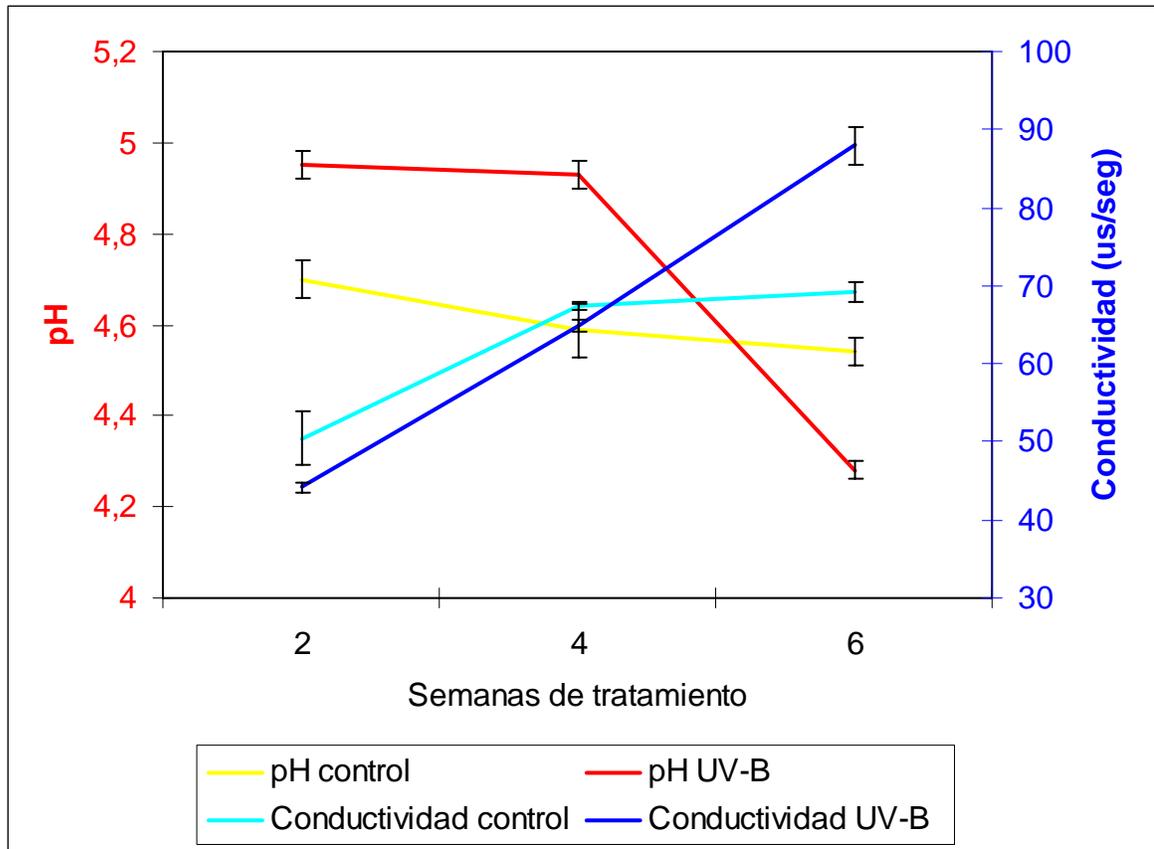
**Figura 17.-** Efecto de la radiación UV-B en el contenido de cenizas (%PS) de tallo y raíz de plántulas de *A. punctatum* ( $n = 3 \pm SD$ ).

#### 4.4.- pH y Conductividad del suelo

La medición de pH y conductividad del suelo nos entrega el estado de nutrición de éste. El pH demuestra la cantidad de  $H^+$  presentes, mientras que la conductividad expresa la totalidad de iones existentes.

En la Figura 18 se observa que en general la acidez en suelos tratados es menor que los controles, exceptuando la 6ª semana en donde se observa una diferencia negativa (-5,73%) (Anexo 2) respecto del control en el  $pH_{KCl}$ , expresando mayor acidez de los suelos y por ende una mayor presencia de iones en la zona radicular de las plántulas tratadas.

Con respecto a la conductividad eléctrica de los suelos (Fig. 18) se observa en general que el porcentaje de variación en la conductividad de plántulas tratadas respecto al control, disminuye en el tiempo (-12,56 y -3,57 %, control 2ª y 4ª semana respectivamente) hasta hacerse mayor (+27,14% 6ª semana). Este valor indicaría un mayor contenido de nutrientes en el suelo de las plántulas tratadas (6ª semana), pudiendo asociarse con el menor contenido de cenizas en las raíces de estas plantas. Este hecho permite sugerir el transporte (exudado) de iones desde la raíz al medio que la circunda.



**FIGURA 18.-** pH y Conductividad en suelos de cultivo de plántulas de *A. punctatum*, mantenidas en condiciones de laboratorio (control) y bajo radiación UV-B (+UV-B) ( $n = 3, \pm SD$ ).

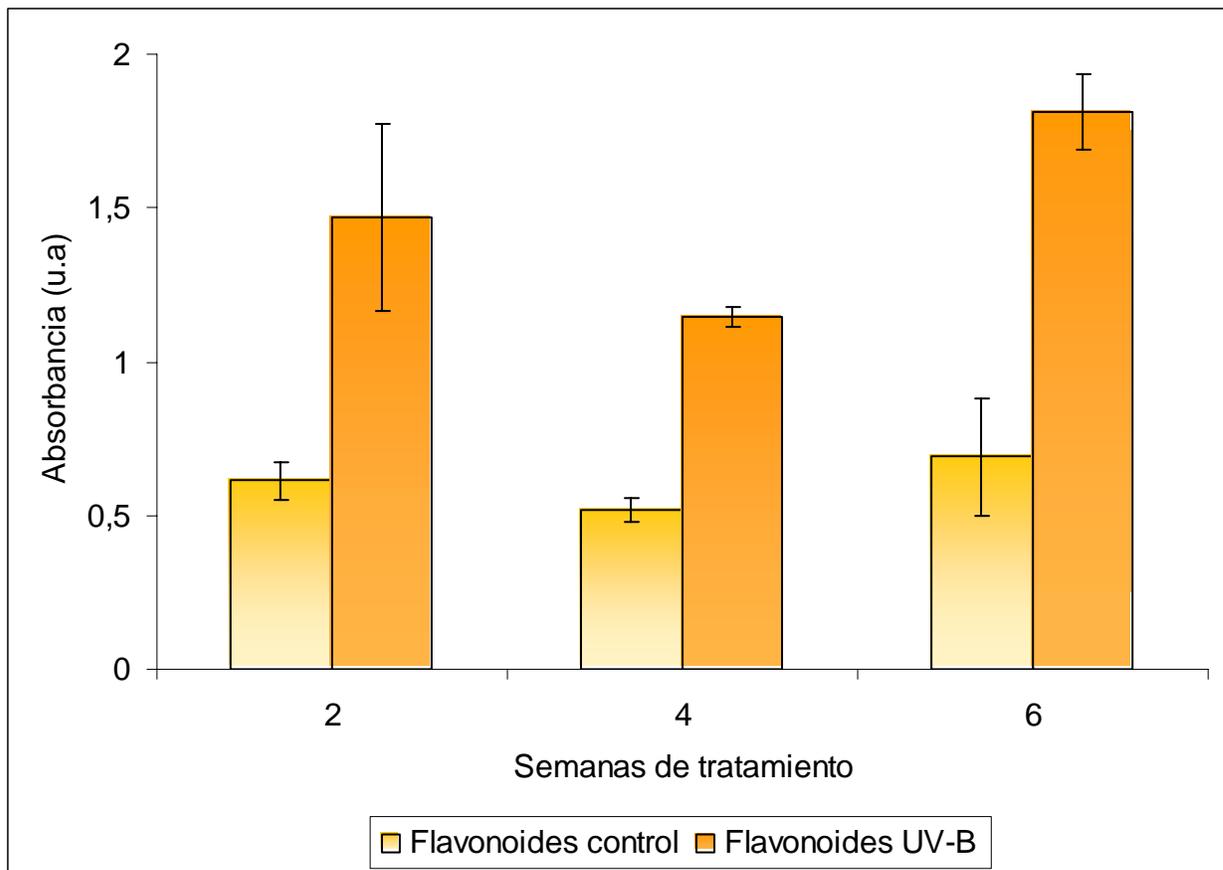
#### **4.5.- Análisis de pigmentos foliares en *Aextoxicon punctatum***

##### **4.5.1.- Determinación de pigmentos foliares totales**

De la separación con éter de petróleo y metanol 40%, se obtuvieron: la fase etérea y fase alcohol-agua. En la primera se encuentran las clorofilas y los carotenos y en la segunda los flavonoides. Ambas fases se determinaron cualitativamente mediante medición en espectrofotómetro UV-visible (Fig. 9 y 10).

El análisis cuantitativo de pigmentos absorbedores y fotosintéticos se realizó mediante espectrofotometría, a través de sus respectivas absorbancias. El espectro UV de los flavonoides exhibe dos bandas de absorbancia en la región 240-400 nm. Estas dos bandas corresponden, según literatura, a la banda I (300-380 nm) y banda II (240-280 nm) esto concuerda con lo encontrado en este estudio (Fig. 10 y Fig. 21). La banda I se asocia con la absorción del anillo B o sistema Cinamoil, y la banda II con la absorción del anillo A o sistema Benzoil. Estos resultados muestran mayores absorbancias en las plantas tratadas, lo cual se debería a la mayor cantidad de flavonoides presentes. Las absorbancias máximas se observaron a 270 nm para flavonoides (Fig. 10), 410 nm para carotenos y 666 nm para clorofilas (Fig. 9). En respuesta a la radiación UV-B se observó el aumento progresivo de la absorbancia máxima de flavonoides, carotenos y clorofila en +23,26%, +19,23% y +22,43% al final del período de ensayo (6ª semana) respecto al contenido de pigmentos de la 2ª semana (Anexo 3). Habiéndose establecido que para flavonoides la unidad de absorbancia es directamente proporcional a la concentración se determinó que en la 6ª semana de tratamiento la concentración de flavonoides aumentó +162,60% respecto de su control (Fig.19). Por todo lo anterior, es posible inferir que la radiación UV-B aplicada y el

período de tratamiento son los responsables del incremento de la concentración de pigmentos obtenida en las plántulas tratadas respecto a sus controles.



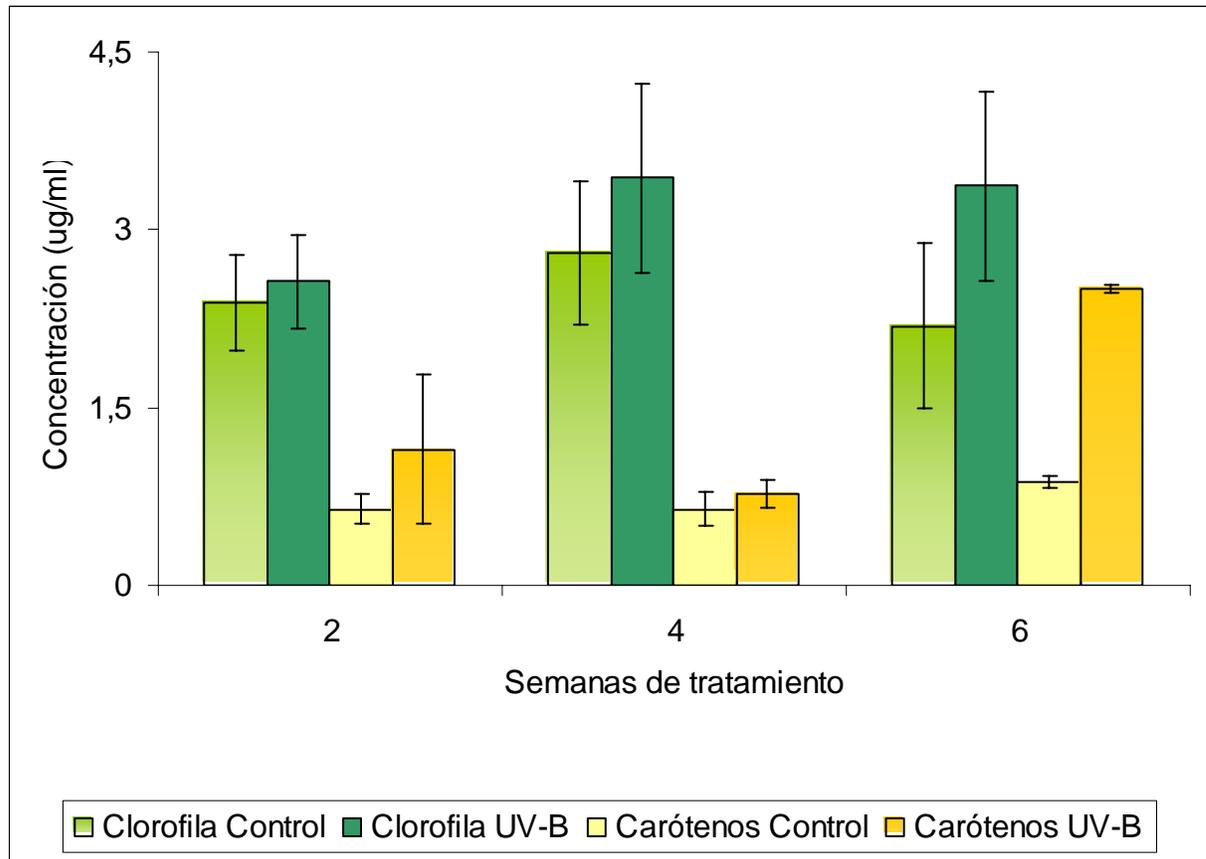
**Figura 19.-** Contenido de flavonoides totales en extracto foliar de plántulas de *A. punctatum*, mantenidas en condiciones de laboratorio exentas de radiación UV-B (control) y aplicando una dosis de  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  de radiación UV-B por 6 horas al día durante un período de 6 meses de tratamiento ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ).

#### 4.5.2.- Determinación de clorofila y carotenos

Respecto a los pigmentos fotosintéticos (Fig. 9) se observó espectro característico de carotenoides, con banda espectral entre los 410 y 450 nm y el de las clorofilas con dos picos máximos entre 422 y 666 nm y 475 con 645 nm, lo cual corresponde a clorofila *a* y *b* respectivamente. Al igual que en los flavonoides, estos pigmentos presentaron mayores absorbancia, es decir, mayor cantidad de pigmentos en las plantas tratadas.

A diferencia de la concentración de pigmentos fotosintéticos observada en las mediciones con espectrofotómetro UV, al aplicar las fórmulas de determinación de concentración de clorofilas y carótenos de Lichtenthaler y Willburn (1987) modificado, se obtuvieron valores diferentes. En la Figura 20 se denota que la concentración de clorofila total, hacia el final de período de tratamiento (semana 6) aumentó en +53,90% en plántulas tratadas respecto al control.

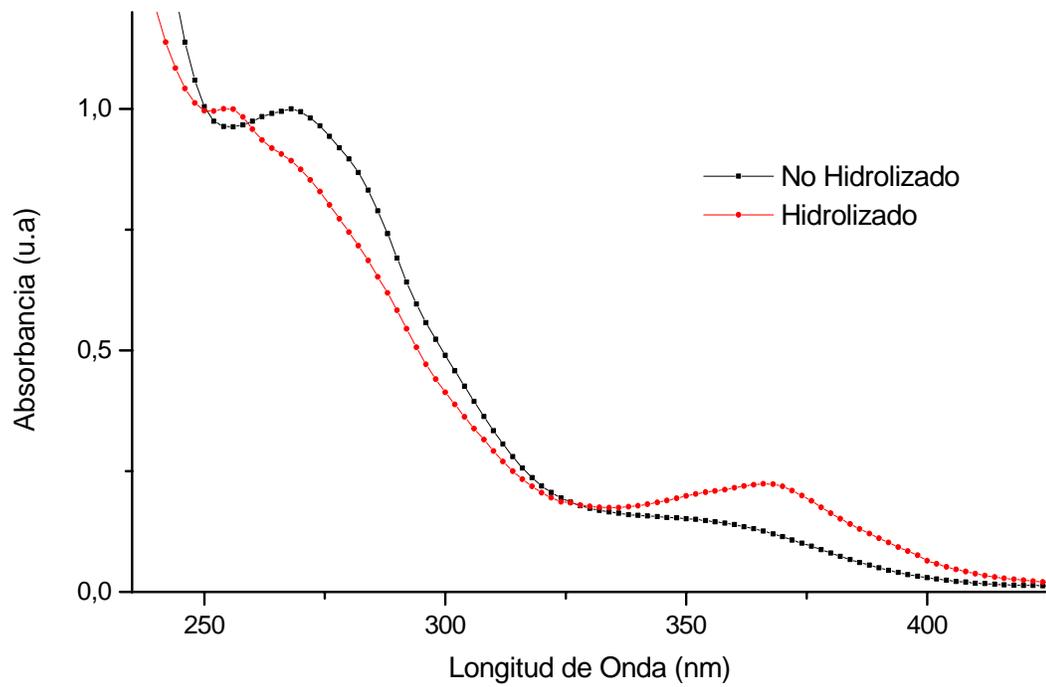
Respecto a los carotenoides (Fig. 20) se encontró que después de la 6<sup>a</sup> semana de tratamiento UV-B aumentaron su concentración en +118,3% respecto de su inicial (semana 2) e incrementando respecto a su control en +184,77% después de 6 semanas de tratamiento.



**Figura 20.-** Concentración de clorofilas y carotenos en µg/ml de extracto foliar de *A. punctatum*, control y tratadas con  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  por 6 horas diarias de radiación UV-B durante 6 semanas de tratamiento (UV-B) ( $n = 3 \pm \text{SD}$ ).

### 4.5.3.- Hidrólisis

Con el fin de realizar una separación de los grupos azúcares de los flavonoides, la fase alcohol-agua que contiene los flavonoides se llevó a hidrólisis. Al separarse ambas moléculas, el espectro de absorción de los flavonoides sufre un leve desplazamiento de la curva hacia mayores longitudes de onda, lo cual se puede apreciar en Figura 21, debido a cambios en la resonancia de las moléculas resultantes de la hidrólisis. Además, producto de esta hidrólisis se obtiene un incremento en las hidroxilaciones del anillo B, lo cual produce un notable efecto batocrómico en la banda I.



**Figura 21.-** Espectro de absorción de flavonoides hidrolizados en comparación con flavonoides no hidrolizados, en extractos foliar de plántulas de *A. punctatum* mantenidas bajo radiación UV-B. En muestras control, las curvas mantienen igual tendencia (n = 3).

#### 4.5.4.- Identificación de flavonoides

Mediante técnica cromatografía de capa fina se identificaron flavonoides, determinando los Rf de las muestras (Fig. 22), contra valores de Rf de patrones respectivos (TABLA 2). De la comparación de factores de retención, se identificaron dos flavonoides: Myricetina y Quercetina (TABLA 3).

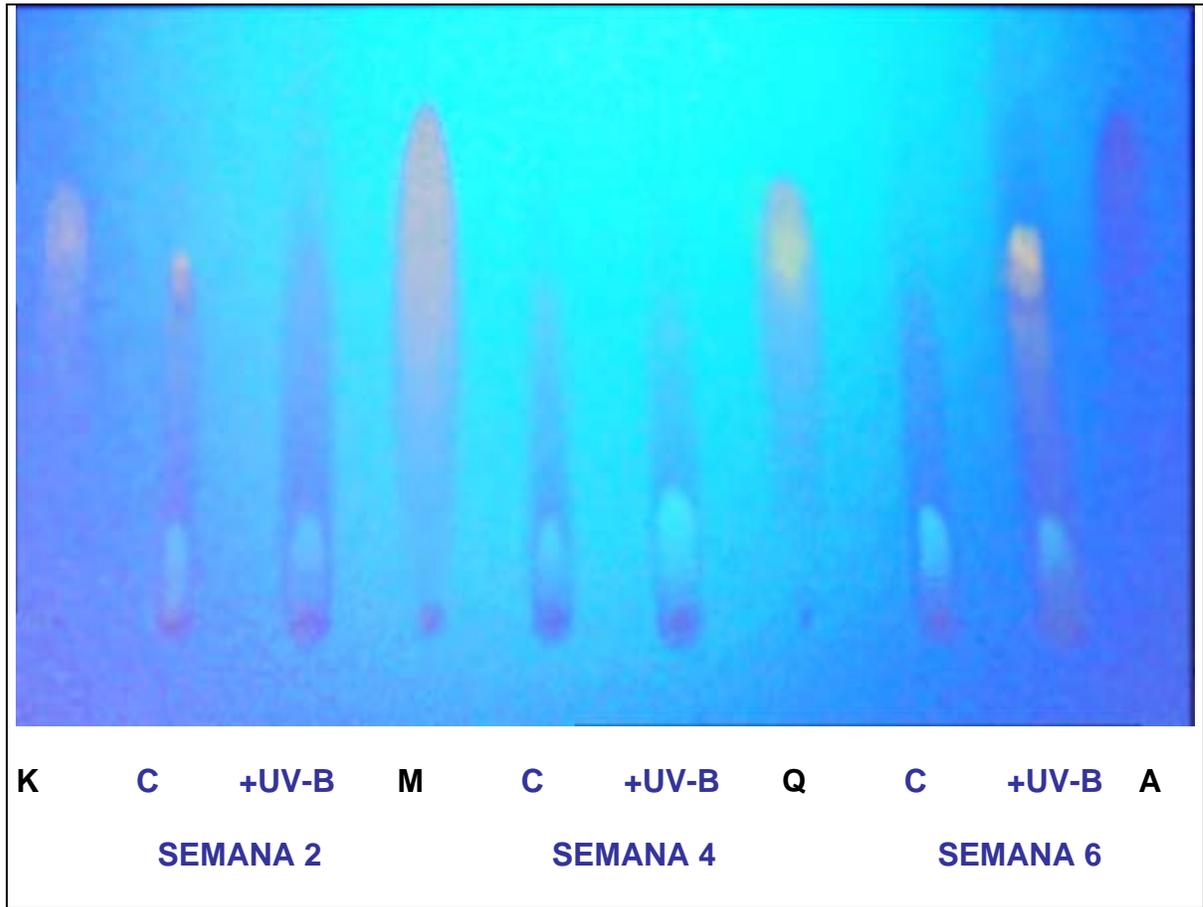
Durante las primeras dos semanas de tratamiento se identificó Myricetina y Quercetina, tanto en plántulas control como tratadas, mientras que al final del período de tratamiento (6ª semana), sólo se evidenció Quercetina no observándose presencia de Myricetina (TABLA 3).

**TABLA 2.-** Distancias de migración (Rf) de estándares puros de flavonoides, en cromatoplasmas de Poliamida y fase móvil Metanol: Acetato de etilo (5:1).

<b>Estándares</b>	<b>Rf (cm)</b>
<b>Apigenina</b>	0.41
<b>Kampferol</b>	0.34
<b>Myricetina</b>	0.33
<b>Quercetina</b>	0.32

**TABLA 3-** Distancias de migración (Rf) de muestras de extractos foliares de plántulas de *A. punctatum* controles y tratadas bajo radiación UV-B durante un período de 6 semanas de tratamiento (distancias determinadas en cromatoplasmas de Poliamida y fase móvil Metanol: Acetato de etilo (5:1)).

<b>Semana de tratamiento</b>	<b>Muestra</b>	<b>Rf (cm)</b>
<b>2</b>	<b>Control</b>	0.33
	<b>+UV-B</b>	0.32
<b>4</b>	<b>Control</b>	0.28
	<b>+UV-B</b>	0.28
<b>6</b>	<b>Control</b>	0.28
	<b>+UV-B</b>	0.32



**Figura 22.-** Cromatopla de poliamida bajo lámpara UV, para identificación de flavonoides en muestras de extracto de plántulas de *A. punctatum*, sometidas a radiación UV (**+UV-B**) y bajo condiciones de laboratorio (control, **C**). Usando estándares puros de: **K** (Kamferol), **M** (Myricetina), **Q** (Quercetina) y **A** (Apigenina).

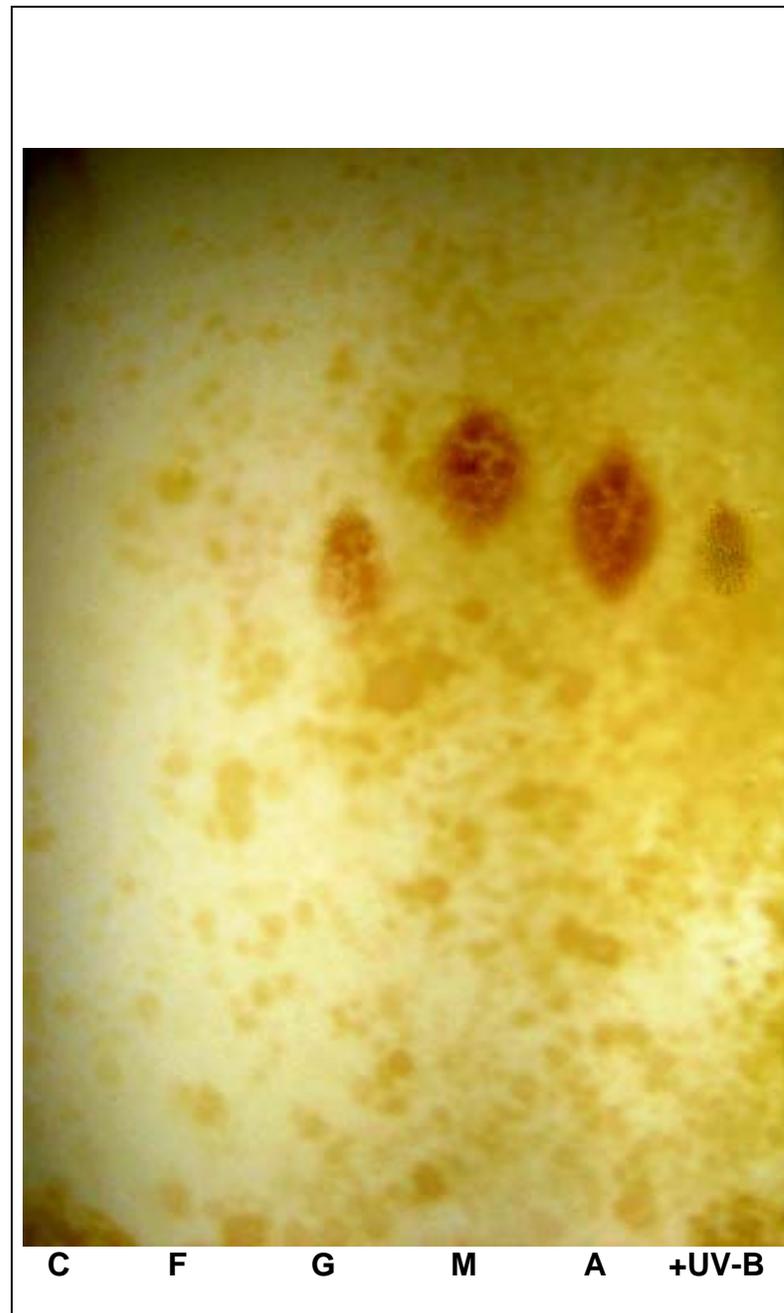
#### **4.5.5.- Identificación de azúcares.**

Posterior a la identificación del flavonoide Quercetina, se procedió a la determinación del glúcido sustituyente mediante TLC.

En Tabla 4 se informan los valores de factor de retención (Rf) para estándares de azúcares puros, de muestras de extractos foliares de plantas control y tratadas. En la muestra control de semana 2, no se evidenció azúcar presente, mientras que en muestra tratada de 6<sup>a</sup> semana logró identificarse glúcido D (+)-Galactosa (Fig. 23). Con respecto a muestras de la 4<sup>a</sup> semana de tratamiento, no se utilizaron, ya que en ellas no se encontraba presente el flavonoide Quercetina para el cual se estudió el azúcar sustituyente en la presente investigación.

**TABLA 4.-** Distancias de migración (Rf) de estándares puros de glúcidos y de muestras de extractos foliares de plántulas de *A. punctatum* controles y tratadas bajo radiación UV-B durante un período de 6 semanas de tratamiento (distancias determinadas en cromatoplasmas de Celulosa y fase móvil Piridina: Acetato de etilo: Ácido acético: Agua (6:6:1:3)).

Estándares	Rf (cm)	Rf	
		Control Semana 2	+UV-B Semana 6
D (+) - Galactosa	0.56	---	+
L (+) - Arabinosa	0.61	---	---
D (-) - Fructosa	0.65	---	---
D - Manosa	0.66	---	---



**Figura 23.-** Cromatoplaca de celulosa usada para identificar azúcares en muestras de extracto de plantas control (**C**) y tratadas (**+UV-B**) bajo radiación por comparación con estándares puros **F** (fructosa), **G** (galactosa), **M** (manosa) y **A** (arabinosa).

## 5.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis, se determinó el efecto que ejerce la radiación UV-B en el tipo y concentración de pigmentos foliares en plántulas de *A. punctatum*, de acuerdo a la dosis administrada y al tiempo de tratamiento. Para ello se utilizaron; técnica TLC en la identificación y espectrofotometría en la determinación de concentración de pigmentos fotosintéticos y protectores. Además, utilizando TLC se buscó identificar el tipo de azúcar sustituyente en la molécula de flavonoide encontrada.

La respuesta a la aplicación de la máxima dosis de radiación UV-B después de 6 semanas de tratamiento fue demostrada en primera instancia en la reducción de la tasa de crecimiento de tallo y raíz, lo cual corrobora los datos expresados por Carvajal (2005) en donde se observó en *L. sempervirens* una disminución de altura en las plantas (-23%) en respuesta al suplemento de radiación UV-B. Esto se explicaría con lo informado por Daubenmure (2001) que expresa que la radiación luminosa de onda corta es responsable de la inactivación de Ácido Indol Acético (AIA) o auxina, hormona estimulante del crecimiento, lo cual conlleva a detención en la elongación del tallo. La disminución de la tasa de crecimiento del tallo estaría dada por el decrecimiento en la concentración de auxinas, debido a el aumento de síntesis de flavonoides lo que es relacionado con control hormonal. Además, flavonoides como Quercetina y Apigenina se han implicado como reguladores endógenos del transporte polar de auxinas lo que también afectaría su concentración (Jansen *et al.* 1998; Taiz *et al.* 2002).

El desprendimiento de hojas observado en las primeras semanas de tratamiento UV-B se detiene con el transcurso del tiempo (6ª semana) y comienza la brotación de

hojas nuevas. Resultados similares que muestran la capacidad de recuperación de las plántulas, ha sido informado por González (2005) y Carvajal (2005). Ellos estudiaron la respuesta al suplemento de radiación UV-B en plántulas de Roble, Raulí, Ulmo y Laurel mantenidas bajo condiciones de radiación solar ambiental.

El engrosamiento de la lámina foliar es un mecanismo que se asocia con protección de los pigmentos fotosintéticos frente a la radiación UV-B aumentando la distancia de incidencia de los rayos ultravioleta, y la concentración de los pigmentos (Olsson *et al.* 1999). Por el contrario, en este estudio se encontró disminución del grosor de la lámina foliar (-17,75%) lo que aparece asociado con la reducción en el grosor del parénquima esponjoso, tejido con grandes espacios intercelulares que acumulan aire saturado de humedad y que actúa como un aislante térmico. La nula variación en el grosor de la cutícula adaxial, compuesta preferentemente por ceras, se vio complementada con el incremento de flavonoides de tipo Quercetina, pigmento absorbedor de UV-B (Ballaré *et al.* 1995).

La capacidad de aclimatación de Olivillo al suplemento de radiación UV-B se refleja en el incremento de biomasa total y en su redistribución obtenida al término de las 6 semanas de tratamiento, encontrándose aumento de la biomasa de raíz y tallo a expensas de la biomasa foliar en las plántulas tratadas. Estos resultados no concuerdan con los valores de conductividad eléctrica, encontrándose que la concentración de nutrientes en el suelo de las plantas tratadas fue mayor que de las plantas control. En este caso, parte de los iones presentes en el suelo podrían deberse a exudados radicales del tipo flavonoides (Pinto *et al.* 2002; Romero información personal) o a variación de la permeabilidad de la membrana radicular.

El incremento de cenizas en +7,3% a nivel de tallo y +10,6% en raíz en plántulas bajo tratamiento UV-B, corroboraría lo expuesto. Estos resultados están soportados por el trabajo de Ballaré *et al.* (1995) los que informan que la irradiancia global tanto como la radiación ultravioleta, regulan en buena medida la cantidad de nutrientes transportados del suelo a las partes aéreas.

De acuerdo a los distintos parámetros medidos, estos demuestran la capacidad de *A. punctatum* de aclimatarse a condiciones excesivas de radiación UV-B. Para observar la respuesta del Olivillo frente a este factor, se determinó la cantidad de clorofila y carotenoides al final de la 6ª semana, encontrándose que en las plantas tratadas la clorofila aumentó un +53,90% y los carotenoides un +184,77% respecto al control, destacándose que el incremento de clorofila fue tanto del tipo *a* (+27,70%) como del tipo *b* (+35,60%). En el caso del trabajo realizado por Carvajal (2005) se encontró que el mayor aumento se produjo en la clorofila del tipo *a*, igual resultado observó González (2005) en especies *N. alpina*, *N. obliqua* y *E. cordifolia*.

Este aumento de carotenoides obtenido en las plántulas de Olivillo expuestas a altas dosis de radiación UV-B contribuiría a la inactivación de las especies reactivas de oxígeno y a la inactivación del estado triplete de la clorofila en un rol de fotoprotección de sistemas fotosintéticos. Dicha respuesta concuerda con resultados obtenidos por Carvajal (2005), en el cual se demostró una significativa elevación en las concentraciones de carotenos totales y en especial de  $\beta$ -caroteno. En organismos acuáticos como algas rojas, se ha encontrado que los carotenoides participan en los mecanismos de fotoprotección en condiciones de alta radiación UV, sugiriendo que  $\beta$ -

caroteno y Zeaxantina inactivan radicales inducidos por UV-B en la membrana fotosintética (Gotz *et al.* 1999).

Es sabido que como respuesta a un exceso de radiación UV-B se incrementa la concentración de pigmentos absorbedores de esta radiación. Entre los más importantes están los flavonoides, pudiendo gatillarse la biosíntesis de flavonoides específicos y dependientes de la radiación UV-B como Quercetina y Kamferol (Rozema *et al.* 1999). Esto es debido a la síntesis de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), involucradas en la biosíntesis de estos compuestos (Ballaré *et al.* 1995). Algunos de los flavonoides sintetizados por acción de la radiación UV-B (Kamferol y Quercetina) tienen mayor capacidad antioxidante, atrapando especies activas del oxígeno como singlete de oxígeno, superóxido y radicales peróxido, y de prevenir el fotoblanqueamiento de carotenoides (Brunn *et al.* 1992).

Similares respuestas de aclimatación al incremento de radiación UV-B se ha reportado en otros estudios (Hess *et al.* 2003), quienes determinaron incremento en el contenido de flavonoides del tipo Kamferol en *S. microphylla* y Quercetina en *S. stipulacea*. Carvajal (2005) y González (2005) encontraron aumentos importantes en la concentración de flavonoides, así en *L. sempevirens* se observaron concentraciones mayores de Quercetina y Kamferol, mientras que en especies *N. alpina*, *N. obliqua* y *E. cordifolia* se encontraron Quercetina y Myricetina en concentraciones elevadas.

Quercetina por poseer un grupo adicional orto- dihidroxil en anillo B, tiene un mayor potencial en la actividad antioxidante. De acuerdo a los criterios químicos establecidos para determinar la capacidad antioxidante de los flavonoides, se ha visto *in vitro* que Quercetina tiene mejores propiedades atrapadoras de superóxidos y otros

radicales libres que Kamferol (Martínez-Flórez *et al.* 2002. Tournaire *et al.* 1993). Estableciéndose además que los glicósidos son menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona (Martínez-Flórez *et al.* 2002).

Los glúcidos o hidratos de carbono son nutrientes contenidos en los alimentos y son las sustancias orgánicas más extendidas en la naturaleza y, la principal fuente de energía. Están compuestos de C, H y O, éstos últimos van en la proporción del agua, de ahí que se llamen hidratos (Valenzuela, 2003).

Los azúcares están comprometidos en casi en todos los aspectos de la biología celular, desde el reconocimiento de patógenos a la coagulación sanguínea. Cumplen funciones en la regulación de la vida media de las hormonas, el curso del desarrollo embriológico y su actuación como "código de dirección" para dirigir el tráfico de células y proteínas a través del organismo o la comunicación de célula a célula o el funcionamiento del sistema inmunológico (Maeder, 2002).

Galactosa no se encuentra en estado libre en la naturaleza sino que unido a otras moléculas. Además, forma parte de nuestro cerebro en donde participa como combustible para las células y en la conducción del estímulo nervioso a través de la vaina de mielina, son los llamados galactocerebrósidos (Vázquez-Contreras, 2003). Éstos son esfingolípidos con una unidad de Galactosa, derivados de ceramidas de origen animal y vegetal, se encuentran en las membranas celulares neuronales del cerebro, y participan además del atrapamiento de radicales libres (Maeder, 2002. Vázquez-Contreras, 2003).

Para *A. punctatum* no se describe en la literatura presencia de flavonoides y mucho menos del tipo de azúcar sustituyente, por lo que por primera vez se estaría

reportando la identificación de Galactosa. Este glúcido reforzaría el efecto antioxidante de Quercetina gracias a sus grupos hidroxilo y a la capacidad innata de Galactosa como antioxidante a nivel cerebral.

A partir de este estudio se demuestra que *A. punctatum* es capaz de incrementar la síntesis de sustancias biológicamente activas con potencial farmacológico (Quercetina, carotenoides y Galactosa), tratando las plantas bajo un estímulo de radiación UV-B. La elevada producción de carotenoides y Quercetina obtenida, podría utilizarse para tratar problemas venosos y de circulación general, gracias a la propiedad cardiotónica de la Quercetina, la cual ejerce efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación general (Challen, 1996). Quercetina según Cadenas (1996), mostró ser, *in vitro*, un poderoso agente antiproliferativo de células anticancerosas humanas y exhibió efectos sinérgicos antiproliferativos con algunos agentes terapéuticos como cisplatino y adriamicina. Además este flavonoide puede inducir apoptosis en células tumorales humanas. Este hecho se relaciona además con investigaciones hechas por Sasisekharan (2002) en donde encontró que una azúcar relacionada con heparina retardaba el crecimiento tumoral y detenía la expansión del cáncer.

La existencia de diversos estudios que avalan las propiedades benéficas de flavonoides, carotenos y azúcares en la salud humana, nos alienta a realizar mayores investigaciones de la presencia de estos compuestos en la flora de nuestro país. Específicamente, en especies nativas de las cuales no se tiene conocimiento de uso medicinal, en pos de contribuir al enriquecimiento del arsenal farmacológico con sustancias biológicamente activas de origen natural. Es así como Galactósido de

Quercetina en extracto foliar de plantas de *A. punctatum* podría proyectarse como un potencial fármaco usado tanto por sus propiedades antioxidantes altas (Martínez-Flórez *et al.* 2002), como por sus cualidades anticancerígenas (Zhang *et al.* 2004) y antiinflamatorias (Martínez-Flórez *et al.* 2002. Youdim *et al.* 2002). Por ello se hace evidente profundizar estas investigaciones respecto de los efectos tanto de flavonoides como de sus azúcares sustituyentes, para el óptimo aprovechamiento de las cualidades de productos naturales.

Por último, se desprende como conclusión de este estudio que, mediante éste método de irradiación se mejoraría la productividad de componentes con elevado potencial farmacéutico.

## 6.- CONCLUSIÓN

En relación a los resultados obtenidos en este estudio y de acuerdo a las condiciones en las que fueron realizados los análisis, se podría concluir que:

Se confirma la hipótesis con respecto a que, la síntesis de pigmentos foliares (Clorofilas, Carotenoides y Flavonoides) aumentó en respuesta a un exceso de radiación UV-B y que la síntesis de algunos tipos de flavonoides es UV-B dependiente.

Se demuestra además que *A. punctatum* es capaz en un corto período de tiempo de adaptarse a condiciones de exceso de radiación UV-B, logrando sintetizar altas concentraciones de compuestos protectores de sus aparatos fotosintéticos.

Se logra por primera vez identificar el azúcar sustituyente de la molécula de flavonoide en plántulas de *A. punctatum*, y se determina además que la radiación UV-B afecta la síntesis de glúcidos, variando en el tipo, y probablemente en la concentración de éstos.

Por último, se concluye que *A. punctatum*, mediante este método de radiación, aumentaría la productividad de sustancias con potencial farmacológico, abriendo la posibilidad de utilizar pigmentos de origen natural dentro de la medicina tradicional.

## 7.- GLOSARIO

- Abaxial:** Parte de un órgano más alejado del eje de la planta, en una hoja es el envés.
- Adaxial:** Parte de un órgano más próximo con respecto a un eje, en las hojas corresponde al haz o cara superior.
- Antiproliferativa:** Que actúa en contra del crecimiento y la división de células.
- Biomasa:** Materia seca que puede ser expresada por unidad de área, volumen o peso.
- Batocrómico:** Cuando la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más grandes o de menor energía por efecto del solvente o por sustituyentes.
- Diurético:** Que aumenta la secreción de orina.
- Digestivo:** Que favorece la digestión.
- Siempre verde:** Especie vegetal que presenta hojas durante todo el año.
- Ozono:** Gas cuyas moléculas contienen tres átomos de oxígeno y cuya presencia en la estratósfera constituye la capa de ozono.

## 8.- Bibliografía

- Arnau J. (2005). En buenas manos: salud y terapias naturales. [www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=834](http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=834)
- Ballaré C. L., Scopel A. L and Sánchez R. A. (1995). Plant photomorphogenesis in canopies, crop growth and yield. *Hort Science* 30:1172:1181.
- Björn, L.O. (1999). Ultraviolet-B radiation, the ozone layer and ozone depletion. Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp. 21-37.
- Brunn S.A., Muday G.K., Haworth P. (1992). Auxin transport and the interaction of phytohormones. *Plant Physiology*. 98:101-107.
- Cadenas E. (1999). Sustancias flavonoides en: Antioxidantes y calidad de vida Online. <http://www.antioxidantes.com.ar/12/home2.htm>
- Carvajal M. (2005). Determinación de pigmentos foliares mediante técnica HPLC en *Laurelia sempervirens* tratada con suplemento de radiación UV-B y su efecto en el crecimiento. Tesis, Escuela de Química y Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, 90pp.
- Challen G.(1996). Flavonoids. <http://www.thenutritionreporter.com/flavonoids.html>
- Clark F., Most Jr. (1988). Experimental Organic Chemistry. Editorial John Wiley and Sons. pp136-145.

- Curran-Celentano J., Burke J. D., Hammond B. Jr. (2002). In vivo assessment of retinal carotenoids: macular pigment detection techniques and their impact on monitoring pigment status. *J. Nutri.* 132: 535S-539S.
- Daubenmure, R.F. 2001. *Ecología vegetal: tratado de autoecología de plantas.* México, Noriega. 496 p.
- Dirección meteorológica de Chile, [http://www.meteochile.cl/Radiacion\\_Info.html](http://www.meteochile.cl/Radiacion_Info.html)
- Domínguez X. (1975) *Cromatografía en papel y en capa delgada.* Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Secretaría general de la Organización de los Estados Americanos. 80p.
- Ferrandiz M., Alcaraz M. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Action.* 32, 283-287.
- Fredmeyer. (2004). <http://www.fredmeyer.com/Es-Supp/Carotenes.htm>
- Fuertes A. (2005). "Beta carotenos y otros carotenoides". [mifarmacia.es](http://www.mifarmacia.es).  
[http://www.mifarmacia.es/producto.asp?Producto=/contenido/articulos/articulo\\_numero\\_betacaroteno\\_y\\_otros](http://www.mifarmacia.es/producto.asp?Producto=/contenido/articulos/articulo_numero_betacaroteno_y_otros)
- González R. A. (2005). Efecto del suplemento de radiación UV-B en el crecimiento y desarrollo de tres arbóreas nativas del Sur de Chile. Tesis de grado Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile. 120 pp.
- Gotz T., Windhovel P. and Sandman G. (1999). Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Physiology.* 120:599-604.

- Hess S., Alvarez L., Iturra G., Romero M. (2002). Evidence of UV-B differential response in *Shopora microphylla* from shady and sunny place. *Rev.Soc.Chil.Quim.* 47, pp501-510.
- Hernández R. G. (2002). Libro Botánica Online. “Fotosíntesis: Clorofila y pigmentos accesorios”. <http://www.forest.ula.ve/~rubenhg/fotosintesis/>
- Ho C., et al.(1992), Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Prev. Med* 21, 520-525.
- Hoffmann A. (1997). Flora silvestre de Chile. Zona araucana. 4ª Ed. Ediciones Fundación Claudio Gay. 258p.
- Jansen M., Gaba V., Greenberg B.M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science.* 3:131-135.
- Karnaukhov VN. (1990). Carotenoids: recent progress problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 95(1):1-20.
- Kohen E., Santus R. y Hirschberg J. (1995) Photobiology. Academic Press. U.S.A.
- Lagrue G., Oliver-Martin F., Grillot A.(1981). A study of the effects of procyanidol oligomers on capillary resistance in hypertension and in certain nephropathies. *Sem. Hosp. Paris.* 57, 1399-1401,
- Lovengreen Ch., Alvarez J., Fuenzalida H., Aritio M. (2002). Radiación ultravioleta productora de eritema en Valdivia. Comparación entre inferencias satelitales, modelos de transferencia radiativa y mediciones desde tierra. *Revista Médica de Chile.*, 130: 17-25.

- Lozano J. A. (1997). Ciencia y salud. “La alimentación: Carotenoides para la salud”. [http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5\\_5\\_10.html](http://canales.laverdad.es/cienciaysalud/5_5_10.html)
- Lozano J. A. (2005). Ciencia y salud. La alimentación: Alimentación y salud. Cáncer y las dietas protectoras. [www.dsalud.com/alimentacion\\_numero78.htm](http://www.dsalud.com/alimentacion_numero78.htm).
- Maeder T. (2002). “Sweet Medicines”. Scientific American Magazine Online. <http://www.sciamdigital.com>
- Martínez S., González J., Culebras J., Tuñón M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17 (6): 271-278.
- Matos C., Schweigert F., Sintes G., Rodríguez G., Hurtienne A., Reyes D., Jiménez E., (2002). Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 16(2):105-13.
- Montenegro G., Timmermann B. (2000). Chile nuestra flora útil: Guía de uso apícola, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. 1ª edición. Ediciones Universidad Católica de Chile. pp33-34.
- Olsson L.C., Veit M., Bornman J.F.(1999). Epidermal transmittance and phenolic composition in leaves of atrazine tolerant and sensitive cultivars of *Brassica napus* grown under enhanced UV-B radiation. *Physiologia Plantarum*, 107:00-00 (In press).
- Pinto M. E., Edwards G. E., Riquelme A. A. (2002). Enhancement of nodulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) by UV-B irradiation. *Functional plant Biology*, 29: 1189:1196.
- Rouessac F., Rouessac A. (2000). Chemical Analysis Modern Instrumental Methods and Techniques. English Edition. John Wiley and Sons, Ltda. pp85-91.

- Rozema J., Staaij J., Björn, L., Nancy, D. 1999. Depletion of stratospheric ozone and solar UV-B radiation: evolution of land plants, UV-screens and function of polyphenolics. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands pp.1-19.
- Sasisekharan R. (2003). Scientific American Online. <http://www.sciamdigital.com>
- Sharma R. (2001). Impact of solar UV-B on tropical ecosystems and agriculture. Case Study: Effect of UV-B on Rice. *Proc. SEAWPIT98 & SEAWPIT2000*, vol.1: 92-101.
- Spiro T., Stigliani W. (2004). *Química medioambiental*. 2º Edición. Editorial Person Educacion S.A. Madrid, España. 520 pp.
- Steubing L., Godoy R., Alberdi M. (2002). *Métodos de ecología vegetal*. Editorial universitaria. 345p.
- Stryer L., Berg J., Tymoczko J. (2002). *Biochemistry*. 5ª edición. Freeman, NewYork, 974 p.
- Sullivan J., Rozema J. (1999). *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. UV-B effects on terrestrial plant growth and photosynthesis*. Editorial Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp1-19.
- Taiz L., Zeiger E. (2002). *Plant physiology*. 3ª edición. Sunderland: Sinauer associates.690p.

- Tournaire C., Croux S., Maurette M. (1993). Antioxidant activity of flavonoids : efficiency of singlet oxygen (1-deltag) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 19:205-215.
- Valenzuela A. (2003). “Monosacáridos estructura y función”. [http://mx.geocities.com/.../monosacaridos\\_b1.html](http://mx.geocities.com/.../monosacaridos_b1.html)
- Vázquez-Contreras E. (2003). “Esfingolípidos”. Bioquímica y Biología Molecular en Línea. <http://bq.unam.mx/~evazquez>
- Yang Cs, Wang Zy. (1992). Tea and cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85(13), 327-335.
- Youdim K. A., McDonald J., Kalt W., Joseph J.A. (2002). Potetial role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults (small star, filled). *J. Nutr. Biochem.* 13: 282-288.
- Zavala J., Ravetta D.,(2002).The effect of solar UV-B radiation on terpenes and biomass production in *Grindelia chiloensis* (Asteraceae), a woody perennial of Patagonia, Argentina. *Plant Ecology*, 161, 185-191.
- Zhang S., Yang X., Morris M. E. (2004). Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-Mediated transport. *Mol. Pharmacology*,65:1208-1216.

**ANEXO 1.- Preparación Oxalato de anilina**

- 0,9 oz. Ácido Oxálico.
- 200 ml agua destilada.
- 1,8 ml anilina.

Agitar hasta completa disolución y almacenar en frasco ámbar y mantener refrigerado.

**ANEXO 2.** Medición pH en suelo de cultivo de plántulas de *A. punctatum*, mantenidas en condiciones de laboratorio (control) y bajo radiación UV-B (+UV-B) (n = 3,  $\pm$  SD).

	$\text{pH}_{\text{agua}}$	$\text{pH}_{\text{KCl}}$	$\text{pH}_{\text{agua}}$	$\text{pH}_{\text{KCl}}$	$\text{pH}_{\text{agua}}$	$\text{pH}_{\text{KCl}}$
	<b>Semana 2</b>		<b>Semana 4</b>		<b>Semana 6</b>	
<b>Control</b>	5.78 $\pm$ 0.06	4.70 $\pm$ 0.03	5.10 $\pm$ 0.1	4.59 $\pm$ 0.3	4.98 $\pm$ 0.05	4.54 $\pm$ 0.02
<b>+UV-B</b>	6.09 $\pm$ 0.3	4.95 $\pm$ 0.04	6.00 $\pm$ 0.1	4.93 $\pm$ 0.06	5.02 $\pm$ 0.2	4.28 $\pm$ 0.03
<b>% variación</b>	+5.36	+5.32	+17.64	+7.41	+0.80	-5.73

**ANEXO 3.** Absorbancia máxima de flavonoides (270 nm), carotenos (410 nm) y clorofilas (666 nm) en extracto de hojas de plántulas de *A. punctatum* mantenidas bajo condiciones de laboratorio (control) y bajo radiación (+UV-B). Los datos fueron obtenidos en espectrofotómetro UNICAM UV 500 a longitud de onda entre 200 y 750 nm (n = 3,  $\pm$  SD).

	Flavonoides			Carotenoides			Clorofilas		
	Control	+UV-B	% var.	Control	+UV-B	% var.	Control	+UV-B	% var.
<b>Semana 2</b>	0.613 $\pm$ 0.06	1.470 $\pm$ 0.3	+139.8	0.223 $\pm$ 0.03	0.338 $\pm$ 0.1	+51.57	0.126 $\pm$ 0.01	0.156 $\pm$ 0.03	+23.81
<b>Semana 4</b>	0.518 $\pm$ 0.04	1.148 $\pm$ 0.3	+121.6	0.222 $\pm$ 0.04	0.308 $\pm$ 0.1	+38.74	0.141 $\pm$ 0.01	0.170 $\pm$ 0.04	+20.57
<b>Semana 6</b>	0.690 $\pm$ 0.2	1.812 $\pm$ 0.1	+162.6	0.254 $\pm$ 0.06	0.403 $\pm$ 0.1	+58.66	0.122 $\pm$ 0.03	0.191 $\pm$ 0.06	+56.56